

Juliana Amorim Vieira Kroon

**O Hipocampo e o Condicionamento Olfatório Aversivo: Mediação  
por receptores glutamatérgicos subtipo NMDA**

Tese submetida ao Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia do Centro  
de Ciências Biológicas da  
Universidade Federal de Santa  
Catarina para a obtenção do título de  
doutor em Farmacologia.

Orientador: Prof. Dr. Antonio de  
Pádua Carobrez

Florianópolis  
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Kroon, Juliana Amorim Vieira

O hipocampo e o condicionamento olfatório aversivo  
[tese] : mediação por receptores glutamatérgicos subtipo  
NMDA / Juliana Amorim Vieira Kroon ; orientador, Antonio  
de Pádua Carobrez - Florianópolis, SC, 2012.  
104 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia.

Inclui referências

1. Farmacologia. 2. Condicionamento olfatório aversivo.  
3. Hipocampo. 4. Receptores glutamatérgicos subtipo NMDA.  
I. Carobrez, Antonio de Pádua. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmacologia.  
III. Título.

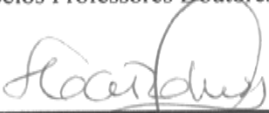
# **“O Hipocampo e o Condicionamento Olfatório Aversivo: Mediação por receptores glutamatérgicos subtipo NMDA”**

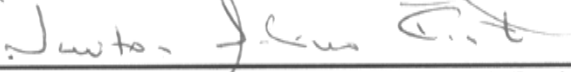
por

**Juliana Amorim Vieira Kroon**

Tese julgada e aprovada em sua forma final  
pelos membros titulares da Banca Examinadora  
(Port. 27/FMC/2012) do Programa de Pós-  
Graduação em Farmacologia - UFSC, composta  
pelos Professores Doutores:

Banca Examinadora:

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Antonio de Pádua Carobrez  
(Presidente/Orientador/FMC/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Newton Sabino Canteras (Instituto de Ciências  
Biomédicas/ USP)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Jorge Quillfeldt (Instituto de Biociências/ UFRGS)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Carlos Rogério Tonussi (FMC/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Leandro José Bertoglio (FMC/CCB/UFSC)

  
\_\_\_\_\_  
Prof(a). Dr(a). Thereza Christina Monteiro De Lima  
Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia

**Florianópolis, 22 de outubro de 2012.**



## **Agradecimentos**

Ao professor Dr. Antonio de Pádua Carobrez pela oportunidade inesquecível de realizar ciência sob sua valiosa orientação, pelo carinho e amizade presentes durante todos os anos de convívio em seu laboratório.

A todos os professores do Departamento de Farmacologia pelos ensinamentos que colaboraram para a minha formação científica.

Aos professores Dr. Newton Sabino Canteras, Dr. Jorge Quillfeldt, Dr. Carlos Rogério Tonussi, Dr. Leandro José Bertoglio e Dr. Reinaldo Naoto Takahashi pelas críticas e sugestões que contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Aos amigos Cris Mochny, Cris Stern, Eloísa, Fabrício, Frank, Grasi, Ju Cavalli, Karina, Lucas e Xima pela força e amizade sempre presentes.

Aos funcionários do departamento e demais colegas da pós-graduação.

Aos meus pais, Valentim e Maria do Carmo, e meu irmão, Fábio, pelo apoio e incentivo em todos os momentos.

Ao meu querido marido, Alexander, por me inspirar a vencer em todos os momentos difíceis.

A CAPES e CNPq pelo suporte financeiro.



## Resumo

Palavras-chave: Condicionamento Olfatório Aversivo. Hipocampo. Receptores glutamatérgicos subtipo NMDA

Memórias olfatórias são geralmente associadas a experiências emocionais; portanto, a associação entre um odor e um evento aversivo tornou-se uma ferramenta importante no estudo da neurobiologia das memórias aversivas. O hipocampo (HPC) parece integrar o Condicionamento Olfatório Aversivo (COA) uma vez que está envolvido tanto em processos cognitivos quanto emocionais. Estes processos parecem estar relacionados a diferenças funcionais observadas ao longo do eixo dorso-ventral do HPC. Adicionalmente, os receptores glutamatérgicos subtipo NMDA parecem exercer um papel chave nos mecanismos envolvidos na aprendizagem e memória emocional. O presente trabalho foi delineado com o objetivo de avaliar o papel dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no HPC dorsal (HPCd) e ventral (HPCv) na formação, potencialização e expressão das memórias aversivas em ratos submetidos ao COA e ao condicionamento contextual de segunda ordem (CCSO). No COA, utilizando um protocolo de condicionamento de primeira ordem, a resposta emocional condicionada (REC) foi adquirida através do pareamento entre o odor de acetato de amila (EC1, estímulo condicionado de primeira ordem) e cinco choques elétricos nas patas (EI, estímulo incondicionado). O CCSO foi promovido pela associação entre o odor condicionado (EC1) e o contexto onde o odor foi exposto (EC2, estímulo condicionado de segunda ordem, caixa de odor). A associação EC1-EI foi realizada na caixa de condicionamento, ao passo que a associação EC1-EC2 ocorreu na caixa de odor. A expressão da REC, composta de três sessões: familiarização (sem odor), teste EC1 (odor condicionado) e teste EC2 (sem odor), foi também conduzida na caixa de odor. Ratos *Wistar* machos submetidos à canulação bilateral do HPCd ou HPCv receberam microinjeções do antagonista dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA AP5 (6 ou 24 nmol/0.5  $\mu$ l) ou do agonista NMDA (100 ou 200 pmol/0.5  $\mu$ l) ou salina tamponada (PBS/0.5  $\mu$ l) antes/depois do condicionamento EC1-EI, ou antes do teste EC1 ou do teste EC2. O AP5 microinjetado no HPCd, mas não no HPCv, antes da associação EC1-EI prejudicou a formação do COA. A expressão do COA, bem como a formação do CCSO, foram prejudicadas pela microinjeção de AP5 tanto no HPCd quanto no HPCv antes da sessão de teste EC1. Contudo, a expressão do CCSO não foi bloqueada pela microinjeção de AP5 pré-teste EC2 em ambas as porções do HPC. Por fim, a

estimulação apenas do HPCd após um protocolo de treino fraco, através da microinjeção do agonista NMDA, promoveu a potencialização do COA, ao passo que a utilização da injeção de NMDA, tanto no HPCd quanto no HPCv, como estímulo incondicionado, não foi capaz de promover o COA. Estes resultados demonstram o papel funcional distinto dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do HPCd e do HPCv na formação do condicionamento aversivo e na expressão da resposta emocional condicionada.



## Abstract

Keywords: Olfactory Fear Conditioning. Hippocampus. Glutamate NMDA receptor-subtype.

Memory for odors is often related to highly emotional experiences; therefore the association between an odor and an aversive event is an effective model to study the neurobiology of associative fear memories. The hippocampus (HPC) seems to be involved in the circuitry of Olfactory Fear Conditioning (OFC) since it is implicated in both cognition and emotion processes. These processes seem to be related to differential functions of the dorsal and ventral portions of HPC. Moreover, glutamate NMDA receptor-subtype has also been shown to be a key element in processes related to emotional learning and memory. The present work was outlined to evaluate the role of glutamate NMDA receptors in the dorsal (HPCd) and ventral HPC (HPCv) on the generation, strengthening and expression of aversive memories of rats submitted to the OFC and contextual second-order conditioning (CSOC) paradigm. In OFC, a first-order conditioning, conditioned emotional response (CER) was acquired by pairing amyl acetate odor (CS1, first order conditioned stimulus) with 5 electrical footshocks (US, unconditioned stimulus). CSOC was promoted by the association between the conditioned odor (CS1) and the context where the odor was exposed (CS2, second-order conditioned stimulus, odor box). The CS1-US association was performed in a conditioning box, while the CS1-CS2 association occurred in an odor box. The expression of CER, composed of three sessions: Familiarization (No odor), CS1 test (Conditioned odor) and CS2 test (No odor), was conducted in an odor box. Male *Wistar* rats bilaterally implanted with guide cannulae aimed at HPCd or the HPCv were injected with NMDA receptor antagonist AP5 (6 or 24nmol /0.5 ul) or NMDA receptor agonist NMDA (100 or 200 pmol/0.5 ul) or phosphate buffered saline (PBS/0.5 ul) before/after the conditioning or prior to the CS1 or to the CS2 test session. AP5 injected into the HPCd, but not into the HPCv, prior to the CS1-US association impaired the generation of OFC. The expression of OFC, as well as the generation of CSOC, was impaired by the injection of AP5 into both HPCd and HPCv prior to the CS1 test session. However, the expression of CSOC was not blocked by the AP5 treatment into both HPC portions prior to the CS2 test session. Finally, the stimulation of HPCd only, after a weak training non-conditioning protocol, through NMDA agonist treatment, promoted OFC potentiation. On the other hand, the utilization of NMDA injection,

either into the HPCd and HPCv, acting as an unconditioned stimulus, was not able to promote OFC. These results demonstrate the different role of glutamate NMDA receptor-subtype in the HPCd and in the HPCv on the generation of aversive conditioning and on the expression of conditioned emotional response.

## **Lista de Figuras**

Figura 1. Esquema representativo da caixa de condicionamento.....	35
Figura 2. Esquema representativo da caixa de odor.....	36
Figura 3. Diagrama esquemático representando o protocolo experimental do condicionamento olfatório aversivo.....	37
Figura 4. Esquema representativo de cortes coronais de encéfalo de rato mostrando os sítios de microinjeção no hipocampo dorsal e no hipocampo ventral.....	43
Figura 5. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal na formação do condicionamento olfatório aversivo.....	46
Figura 6. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral na formação do condicionamento olfatório aversivo.....	48
Figura 7. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na formação do condicionamento contextual de segunda ordem.....	50
Figura 8. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na formação do condicionamento contextual de segunda ordem.....	52
Figura 9. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal na expressão do condicionamento contextual de segunda ordem.....	54
Figura 10. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral na expressão do condicionamento contextual de segunda ordem.....	56
Figura 11. Efeito da infusão de NMDA no hipocampo dorsal na formação do condicionamento olfatório aversivo.....	58
Figura 12. Efeito da infusão de NMDA no hipocampo dorsal na potencialização do condicionamento olfatório aversivo.....	60
Figura 13. Efeito da infusão de NMDA no hipocampo ventral na formação do condicionamento olfatório aversivo.....	62

Figura 14. Efeito da infusão de NMDA no hipocampo ventral na potencialização do condicionamento olfatório aversivo.....64

Figura 15. Diagrama esquemático da circuitaria encefálica envolvida na formação do condicionamento olfatório aversivo.....78

Figura 16. Diagrama esquemático da circuitaria encefálica envolvida na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na formação do condicionamento contextual de segunda ordem.....79

## Lista de abreviaturas e siglas

AHN – núcleo anterior hipotalâmico  
AMPA –  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato  
ANOVA – análise de variância  
AP – ântero-posterior  
AP5 – ( $\pm$ )-ácido-2-amino-5-fosfanopentanóico  
°C – graus Celsius  
CA – Corno de Amon  
Cainato – 2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina  
CCA – córtex cingulado anterior  
cm – centímetros  
DV – dorso-ventral  
EC1 – estímulo condicionado de primeira ordem  
EC2 – estímulo condicionado de segunda ordem  
EI – estímulo incondicionado  
e.p.m. – erro padrão da média  
EUA – Estados Unidos da América  
g - grama  
HPC - hipocampo  
HPCd – hipocampo dorsal  
HPCv – hipocampo ventral  
kg – quilograma  
Ltda - limitada  
LTP – potencialização de longa duração (do inglês, *long term potentiation*)  
mA – miliampere  
MCP – matéria cinzenta periaquedutal  
MCPdl – matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral  
MCPvl – matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral  
mg – miligrama  
Mg<sup>2+</sup> - magnésio  
ml – mililitros  
ML – médio-lateral  
mm – milímetros  
n° – número  
NMDA – N-metil-D-aspartato  
nmol – nanomol  
P.A. – pró-análise  
PBS – solução salina tamponada em fosfato  
PMd – Núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo

pmol – picomol

POR – córtex pós-rinal

RSP – córtex retroesplenial

s – segundos

SDHM – sistema defensivo hipotalâmico medial

SIC – sistema de inibição comportamental

TEPT – transtorno de estresse pós-traumático

VMH – núcleo ventromedial hipotalâmico

μm – micrômetro

μmol - micromol

μl - microlitro

## Sumário

<b>1. Introdução.....</b>	<b>17</b>
1.1 O Condicionamento Aversivo.....	17
1.1.1 As Bases Neurais do Condicionamento Aversivo.....	19
1.1.1.1 O Hipocampo.....	20
1.1.2 Os receptores glutamatérgicos subtipo NMDA e o Condicionamento Aversivo.....	26
1.1.3 O Condicionamento Olfatório Aversivo.....	27
<b>2. Objetivos.....</b>	<b>31</b>
<b>3. Material e Métodos.....</b>	<b>33</b>
3.1 Animais.....	33
3.2 Cirurgia Estereotáxica.....	33
3.3 Drogas e Soluções.....	34
3.4 Microinjeção Intrahipocampal.....	34
3.5 Equipamentos.....	35
3.6 Teste Comportamental: Condicionamento Olfatório Aversivo.....	36
3.7 Comportamentos defensivos avaliados.....	38
3.8 Protocolos Experimentais.....	38
3.8.1 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo na formação do condicionamento olfatório aversivo.....	38
3.8.2 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na formação do condicionamento contextual de segunda ordem.....	39
3.8.3 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo na expressão do condicionamento contextual de segunda ordem.....	40
3.8.4 Efeito da estimulação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo no condicionamento olfatório aversivo.....	40
3.9 Perfusão e Histologia.....	42
3.10 Análise Estatística.....	44
<b>4. Resultados.....</b>	<b>45</b>
4.1 <i>Experimento 1</i> : Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal na formação do condicionamento olfatório aversivo.....	45
4.2 <i>Experimento 2</i> : Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral na formação do condicionamento olfatório aversivo.....	47
4.3 <i>Experimento 3</i> : Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na formação do condicionamento contextual de segunda ordem.....	49

4.4 <i>Experimento 4</i> : Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na formação do condicionamento contextual de segunda ordem.....	51
4.5 <i>Experimento 5</i> : Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal na expressão do condicionamento contextual de segunda ordem.....	53
4.6 <i>Experimento 6</i> : Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral na expressão do condicionamento contextual de segunda ordem.....	55
4.7 <i>Experimento 7</i> : Efeito da estimulação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo dorsal no condicionamento olfatório aversivo.....	57
4.7.1 <i>Experimento 7.1</i> : Efeito da infusão de NMDA no hipocampo dorsal na formação do condicionamento olfatório aversivo.....	57
4.7.2 <i>Experimento 7.2</i> : Efeito da infusão de NMDA no hipocampo dorsal na potencialização do condicionamento olfatório aversivo.....	59
4.8 <i>Experimento 8</i> : Efeito da estimulação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo ventral no condicionamento olfatório aversivo.....	61
4.8.1 <i>Experimento 8.1</i> : Efeito da infusão de NMDA no hipocampo ventral na formação do condicionamento olfatório aversivo.....	61
4.8.2 <i>Experimento 8.2</i> : Efeito da infusão de NMDA no hipocampo ventral na potencialização do condicionamento olfatório aversivo.....	63
<b>5. Discussão.....</b>	<b>65</b>
<b>6. Conclusões.....</b>	<b>81</b>
<b>7. Referências.....</b>	<b>83</b>



## **1. Introdução**

### **1.1 O Condicionamento Aversivo**

No início do século XX, o fisiologista russo Ivan Petrovich Pavlov introduziu à ciência o conceito de “reflexo condicionado” ao publicar o livro “Reflexo Condicionado: Uma investigação da atividade fisiológica do córtex cerebral”. Utilizando a taxa de salivação em cães como ferramenta no estudo do reflexo condicionado, Pavlov observou que estes animais salivavam na presença de comida, mas não exibiam esta resposta ao serem expostos apenas ao som de uma campainha. Contudo, após várias apresentações do som da campainha na presença da comida, a resposta de salivação, ou o reflexo condicionado, passou a ser observado pela exposição apenas ao som da campainha (PAVLOV, 1927). Estas observações acerca do reflexo condicionado foram pioneiras no estudo do aprendizado associativo, também denominado condicionamento Pavloviano ou clássico, e impulsionaram o estudo de várias formas de condicionamento, dentre elas o aprendizado aversivo.

Ainda no início do século XX, o psicólogo americano John Watson e sua assistente Rosalie Rayner publicaram um trabalho sobre o aprendizado aversivo em humanos, o famoso estudo de “Little Albert”, um bebê de onze meses de idade (WATSON; RAYNER, 1920). Neste experimento, Watson e Rayner observaram que a apresentação de um rato não causava qualquer resposta de medo ao bebê. Contudo, após várias apresentações do rato na presença de um som estridente, comportamentos de esquiva e choro passaram a ser exibidos pelo bebê Albert pela exposição apenas ao rato.

Em linhas gerais, o aprendizado aversivo, ou o condicionamento aversivo Pavloviano, trata-se de um aprendizado em que determinados estímulos sensoriais (ex. som, luz, odor) podem prever a ocorrência de um evento aversivo (para revisão, ver MAREN, 2001). O condicionamento aversivo ocorre quando um estímulo emocionalmente neutro é associado a um estímulo incondicionado (EI) aversivo. Após um ou alguns pareamentos, o estímulo neutro adquire a capacidade de gerar respostas defensivas que tipicamente ocorrem na presença de perigo, tornando-se um estímulo condicionado de primeira ordem (EC1) (para revisão, ver LEDOUX, 2000). Ainda, a significância aversiva adquirida pelo EC1, em alguns casos, é suficiente para promover uma nova associação aversiva, a qual recebe o nome de condicionamento de segunda ordem. Neste novo aprendizado aversivo, um estímulo neutro é pareado com o EC1. Após esta associação, o estímulo inicialmente

neutro adquire valência emocional, tornando-se um estímulo condicionado de segunda ordem (EC2), o qual passa a ser capaz de gerar respostas defensivas condicionadas (para revisão, ver GEWIRTZ; DAVIS, 1998; 2000). Em geral, a análise do condicionamento aversivo é realizada através da quantificação das respostas defensivas condicionadas que incluem, além de alterações autonômicas e endócrinas, a expressão de reflexos e comportamentos defensivos (para revisão ver, FENDT; FANSELOW, 1999; KIM; JUNG, 2006; LEDOUX, 2000).

A memória aversiva desenvolve-se e manifesta-se em diferentes estágios. A formação da memória aversiva compreende a aquisição inicial e a consolidação da informação. A aquisição é o primeiro estágio do aprendizado, onde o estímulo neutro é associado ao estímulo emocionalmente relevante (EI) e adquire a capacidade de provocar respostas defensivas condicionadas (para revisão, ver GARAKANI; MATHEW; CHARNEY, 2006). A consolidação é a fase seguinte, onde ocorre o armazenamento da memória recém adquirida. Nesta fase, ocorre a conversão da memória de curto prazo em memória de longa duração, um processo dependente de síntese proteica (para revisão, ver MCGAUGH, 2000). A evocação da memória aversiva é o acionamento representativo da associação EC-EI – estabelecida pelo condicionamento aversivo – em resposta ao EC. A expressão da memória aversiva necessariamente envolve a recuperação, assim como a tradução da associação numa resposta aversiva apropriada (GARAKANI; MATHEW; CHARNEY, 2006). Uma vez evocada, a memória aversiva pode se tornar lábil e sofrer um processo de reconsolidação. Este processo promove a estabilização, via síntese proteica, da memória recuperada e lábil, para persistir como uma memória aversiva de longa duração (DUDAI, 2006; NADER; SCHAFE; LEDOUX, 2000). Ainda, a evocação da memória aversiva pode promover o processo de extinção. Esta é a redução gradual da habilidade do EC em promover respostas aversivas condicionadas que ocorrem quando o EC é apresentado repetidamente na ausência do EI. Diferente da reconsolidação, a extinção envolve um processo de novo aprendizado (para revisão, ver QUIRK, MUELLER, 2008; SOTRES-BAYON; BUSH; LEDOUX, 2004).

O aprendizado aversivo proporcionou a sobrevivência de diversas espécies frente a ameaças presentes ou futuras, uma vez que é um componente essencial de alguns sistemas defensivos dos mamíferos (FANSELOW, 1994). Apesar do caráter adaptativo do aprendizado aversivo, a reexperiência de eventos traumáticos através da evocação

recorrente e persistente de memórias aversivas supostamente seria a base de alguns transtornos psiquiátricos caracterizados pela exacerbação de estados de ansiedade e medo, como o transtorno de estresse pós-traumático (TEPT). Desta forma, o estudo da neurobiologia do aprendizado aversivo promove, além do entendimento de como as emoções influenciam o comportamento, o desenvolvimento de novos tratamentos ou até mesmo a cura de alguns transtornos de ansiedade (FENDT; FANSELOW, 1999).

### **1.1.1 As Bases Neurais do Condicionamento Aversivo**

Ao longo dos anos, muitos estudos têm sido conduzidos com o objetivo de elucidar as bases neuroanatômicas envolvidas no condicionamento aversivo. Em 1963, Kellicutt e Schwartzbaum, e mais tarde, Blanchard e Blanchard (1972) demonstraram o papel fundamental da amígdala na aquisição de uma resposta emocional condicionada em ratos. Em 1975, Cohen observou um prejuízo nas respostas condicionadas autonômicas em pombos com lesão em uma área análoga à amígdala. Davis e colaboradores (1982) demonstraram, em ratos, a importância da amígdala na expressão das respostas de sobressalto potencializado pelo medo. Ainda, utilizando a associação entre um som e o choque elétrico nas patas, Ledoux e colaboradores (1984, 1988, 1990) observaram o papel da amígdala na circuitaria do condicionamento auditivo aversivo em ratos. Estes resultados pioneiros demonstraram a importância da amígdala na memória e aprendizagem emocional (MCGAUGH, 2004), sacramentando esta estrutura como integrante da circuitaria do condicionamento aversivo. Estudos posteriores têm demonstrado a relevância dos núcleos amigdalares nas etapas de aquisição (BUSCH et al., 2010; CAMPEAU; MISERENDINO; DAVIS, 1992; LEDOUX, 1990; MISERENDINO et al., 1990), consolidação (GALE, 2004; MAREN et al., 2003; SCHAFE; LEDOUX, 2000), expressão (KIM; DAVIS, 1993; LEE; WALKER; DAVIS, 1996; MAREN, 1999b; MAREN et al., 1996), reconsolidação (NADER, SCHAFE; LEDOUX, 2000) e extinção de memórias aversivas (DAVIS; MYERS, 2002; WALKER; DAVIS, 2002).

Embora a amígdala já esteja estabelecida na literatura como estrutura importante na promoção do condicionamento aversivo, outras estruturas encefálicas também parecem contribuir na formação das memórias aversivas. O córtex cingulado anterior exibe um papel importante na formação de memórias aversivas (RESTIVO et al., 2009; TANG et al., 2005). O *vermis* cerebelar participa não somente na

regulação das respostas autonômicas e motoras, mas também na formação da associação EC-EI do condicionamento aversivo (SACHETTI; SCELFO; STRATA, 2009). Além disso, a matéria cinzenta periaquedutal (MCP), estrutura mesencefálica previamente apontada exclusivamente como via final e comum das respostas aversivas (BANDLER, 1987; GRAEFF; CAROBREZ; SILVEIRA, 1988), parece participar também do processamento associativo durante o condicionamento aversivo, uma vez que a estimulação da coluna dorsal desta estrutura pode ser utilizada como estímulo incondicionado em alguns paradigmas de medo (CASTILHO; BRANDÃO, 2001; DI SCALA et al., 1987; JENCK; MOREAU; MARTIN, 1995; KINCHESKI, 2011; MARTINEZ; DE OLIVEIRA; BRANDAO, 2006). Adicionalmente, o núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (PMd), estrutura integrante do Sistema Defensivo Hipotalâmico Medial (SDHM) (CANTERAS, 2002; CANTERAS et al., 1997), envolvido na expressão de respostas defensivas anti-predatórias, ao ser estimulado quimicamente, age como estímulo incondicionado na formação do condicionamento aversivo (PAVESI; CANTERAS; CAROBREZ, 2011). Além das estruturas encefálicas acima mencionadas, vários estudos apontam o papel fundamental do hipocampo na formação de alguns tipos de memórias aversivas (BAST; ZHANG; FELDON, 2001; KIM; FANSELOW, 1992; MAREN; HOLT, 2004; MCECHRON et al., 1998; 2000; PHILLIPS; LEDOUX, 1992; QUINN et al., 2002; SELDEN et al., 1991; YOON; OTTO, 2007; ZHANG; BAST; FELDON, 2001).

#### **1.1.1.1 O Hipocampo**

A formação hipocampal está localizada no lobo temporal e é composta pelo hipocampo propriamente dito, giro denteado, complexo subicular e córtex entorrinal (AMARAL; WITTER, 1989).

A citoarquitetura básica do hipocampo foi estabelecida originalmente por Santiago Ramon y Cajal e Raphael Lorente de Nó. Lorente de Nó cunhou a nomenclatura mais utilizada, dividindo o hipocampo em três regiões: CA1, CA2 e CA3 (abreviação de “Corno de Amon”, nomenclatura sugerida em homenagem ao deus egípcio Amon, cujo símbolo era um cordeiro) (LORENTE DE NÓ; 1934 *apud* ANDERSEN et al., 2007; RAMON Y CAJAL; 1911 *apud* ANDERSEN et al., 2007).

A formação hipocampal mantém um padrão organizado de conexões, caracterizando a circuitaria clássica denominada “via

trissináptica”. O córtex entorrinal é considerado o primeiro passo da circuitaria intrínseca do hipocampo, particularmente pelo fato de que as aferências neocorticais que alcançam a formação hipocampal chegam através desta estrutura. Células das camadas superficiais do córtex entorrinal dão origem a axônios que se projetam, entre outros destinos, para o giro denteado. Estas projeções do córtex entorrinal para o giro denteado formam a via perforante. As células granulares do giro denteado dão origem a axônios denominados “fibras musgosas”, que se conectam com células piramidais da região CA3 do hipocampo. As células piramidais de CA3 constituem a principal fonte de aferência para a região CA1 do hipocampo (por meio da via colateral de Schaffer). Outras conexões integram a formação hipocampal e foram incorporadas à circuitaria trissináptica: uma via perforante originada no córtex entorrinal projeta-se para o giro denteado, bem como para a região CA3. Outra via perforante alcança a região CA1 e o subículo. A região CA1 envia projeções para o subículo que, por sua vez, projeta-se para outras regiões do complexo subicular. Adicionalmente, o campo CA1 pode se projetar também para camadas mais profundas do córtex entorrinal (para revisão, ver ANDERSEN et al., 2007).

Ao longo do seu eixo dorso-ventral o hipocampo também apresenta divisões, sendo que Cajal (1901) foi o primeiro a demonstrá-las (CAJAL, 1901 *apud* FANSELOW; DONG, 2010). Originalmente, Cajal distinguiu duas vias perforantes provenientes do córtex entorrinal, superior e inferior, que tinham como alvo o que foi referido mais tarde como hipocampo “dorsal” e “ventral”, respectivamente (FANSELOW; DONG, 2010). Estudos posteriores demonstraram que o córtex entorrinal está dividido em três zonas independentes orientadas de forma rostrocaudal: a zona caudolateral, a intermediária e a rostromedial. Em resumo, a zona caudolateral projeta-se especificamente para a região dorsal do hipocampo, a zona medial para a região ventral do hipocampo e a zona intermediária para regiões intermediárias hipocámpais (DOLORFO; AMARAL, 1998). Portanto, o hipocampo parece não agir como uma estrutura unitária, mas exibe uma porção dorsal (polo septal) e uma ventral (polo temporal), bem caracterizadas, com conexões diferentes e funções determinadas. Adicionalmente, uma porção intermediária com conexões difusas e função pouco definida tem sido descrita (MOSER; MOSER, 1998). Estudos de análise de expressão gênica observaram uma distribuição espacial heterogênea nos padrões de expressão gênica ao longo do eixo rostro-caudal hipocampal de camundongos. Estes dados associados às evidências anatômicas e funcionais confirmam a segmentação do hipocampo em três regiões bem

delimitadas, a zona dorsal, a intermediária e a ventral (DONG et al., 2009; FANSELOW; DONG, 2010; THOMPSON et al., 2008).

O hipocampo dorsal e o complexo subicular dorsal projetam-se densamente para o córtex retrosplenial e o córtex cingulado anterior (CENQUIZCA; SWANSON, 2007; VAN GROEN; WYSS, 2003; VOGT; MILLER, 1983), regiões primariamente envolvidas no processamento da memória (FRANKLAND et al., 2004; HAIJIMA; ICHITANI, 2012) e navegação espacial (POTHUIZEN; AGGLETON; VANN, 2008). O complexo subicular dorsal envia projeções densas, através do fórnix pós-comissural, para os núcleos mamilares lateral e medial e, também, para o complexo talâmico anterior (ISHIZUKA, 2001; KISHI et al., 2000; SWANSON; COWAN, 1975), estruturas repletas de neurônios relacionados à navegação espacial (TAUBE, 2007). Estas estruturas subcorticais enviam projeções de volta ao hipocampo dorsal e córtex retrosplenial (RISOLD, THOMPSON, SWANSON, 1997). O circuito CA1 dorsal-complexo subicular dorsal-corpos mamilares-núcleo talâmico anterior promove o registro de um mapa cognitivo responsável pelos sistemas de direção/navegação permitindo ao animal orientação apropriada e execução de comportamentos em determinado ambiente (JEFFERY, 2007). Além disso, a conexão da porção dorsal do hipocampo com outras áreas, através do núcleo *accumbens* (SWANSON; KOHLER, 1986), como a área tegmental ventral e a parte reticular da substância nigra também colaboram no controle de aspectos relacionados à locomoção, orientação de movimentos e direção espacial (SWANSON; KALIVAS, 2000). Desta forma, a porção dorsal hipocampal em conjunto com áreas densamente conectadas a ela está intimamente relacionada com a modulação de processos cognitivos tais como aprendizagem, memória, navegação e exploração (FANSELOW; DONG, 2010).

Utilizando testes de aprendizagem e navegação espacial, tais como o labirinto radial (OLTON; SAMUELSON, 1976) e o labirinto aquático (MORRIS, 1981), estudos identificaram a importância do hipocampo no processamento da memória e navegação espacial (JARRARD, 1978; MORRIS et al., 1982; OLTON; WALKER; GAGE, 1978), sobretudo sua região dorsal (BANNERMAN et al., 1999; 2002; MOSER; MOSER; ANDERSEN, 1993; MOSER et al., 1995; POTHUIZEN et al., 2004). Apesar da maioria dos trabalhos apontarem a importância predominante da região dorsal do hipocampo no processamento da memória espacial, alguns trabalhos observaram a participação conjunta do hipocampo ventral na formação e evocação deste tipo de memória. Ferbinteanu e colaboradores (2003)

demonstraram que lesões excitotóxicas tanto na região dorsal quanto na ventral promoveram um prejuízo na aquisição da informação espacial em ratos submetidos ao labirinto aquático de Morris. Utilizando este mesmo paradigma, Loureiro e colaboradores (2012) observaram, através de inativação reversível, que houve o maior recrutamento da região dorsal do hipocampo durante a aquisição da memória espacial. Contudo, a evocação desta memória e/ou a expressão de sua representação necessitou tanto da região dorsal quanto da ventral quando a tarefa foi aprendida com o hipocampo inteiramente funcional.

A região CA1 ventral e o complexo subicular ventral exibem densa conectividade bidirecional com núcleos amigdalares (CENQUIZCA; SWANSON, 2007; KISHI et al., 2000; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001; PITKANEN et al., 2000). Ainda, CA1 e complexo subicular ventral e estes núcleos amigdalares exibem projeções bidirecionais com o córtex pré-frontal (CHIBA, 2000; THIERRY et al., 2000). Estas estruturas formam uma série de projeções que inervam diretamente ou indiretamente as zonas periventricular e medial do hipotálamo, estrutura intimamente relacionada no controle de importantes comportamentos motivacionais com forte componente emocional, tais como ingestão, reprodução e defesa (DONG, PETROVICH; SWANSON, 2001; DONG; SWANSON, 2006; KISHI et al., 2000; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001).

A região CA1 ventral, através do complexo subicular ventral e regiões mediais do córtex entorrinal, envia projeções ao núcleo *accumbens* (GROENEWEGEN; WRIGHT; BEIJER, 1996; NABER; WITTER, 1998), estrutura primariamente envolvida em processos de recompensa e comportamento motivacional relacionado à ingestão (KELLEY et al., 2005; KELLEY, BALDO; PRATT, 2005). Além disso, conexões com a zona paraventricular hipotalâmica e núcleo hipotalâmico dorsomedial promovem influências no estado comportamental geral e afetivo (CENQUIZCA; SWANSON, 2007; KISHI et al., 2000).

Conexões entre CA1, complexo subicular ventral e núcleos amigdalares adjacentes enviam densas projeções à parte ventral do septo lateral e núcleo anteromedial do núcleo do leito da estria terminal, dois importantes núcleos conectados ao hipotálamo (CANTERAS; SIMERLY; SWANSON, 1992; DONG; PETROVICH; SWANSON, 2001; RISOLD; SWANSON, 1996). As projeções do hipocampo ventral ao núcleo do leito da estria terminal, estrutura conectada ao núcleo paraventricular hipotalâmico, parecem estar associadas a disfunções neuroendócrinas relacionadas a distúrbios psiquiátricos tais como os

transtornos de ansiedade (DONG; SWANSON, 2006; FANSELOW; DONG, 2010). As projeções hipocâmpais, via septo lateral, alcançam o núcleo anterior hipotalâmico e podem, desta forma, influenciar o SDHM (CANTERAS, 2002; CANTERAS et al., 2008; GROSS; CANTERAS, 2012).

Esta robusta conectividade com o hipotálamo e a amígdala indica a importância do hipocampo ventral no controle da emocionalidade (MOSER; MOSER, 1998). Estudos de lesões do hipocampo ventral em roedores demonstraram reduções significativas no comportamento defensivo expresso em testes comportamentais de ansiedade, tais como: caixa claro-escuro (BANNERMAN et al., 2003), labirinto em cruz elevado (DEGROOT; TREIT, 2004; KJELSTRUP et al., 2002) e exposição ao odor de gato (PENTKOWSKI et al., 2006). Além disso, Kjelstrup e colaboradores (2002) demonstraram que animais com lesão no hipocampo ventral confinados em uma caixa intensamente iluminada apresentam uma redução da concentração plasmática de corticosterona, um hormônio liberado como resposta a eventos ou situações estressantes. Estes achados sugerem que a região ventral do hipocampo exibe um importante papel na modulação da ansiedade. Adicionalmente, há evidências que demonstram a participação da região dorsal do hipocampo nos mecanismos relacionados à ansiedade. Utilizando o labirinto em cruz elevado e o teste de Vogel, Spolidório e colaboradores (2007) observaram efeitos ansiolíticos induzidos pela inibição da via Óxido Nítrico-Monofosfato de Guanosina cíclico no hipocampo dorsal de ratos. Além disso, Carvalho e colaboradores (2008) observaram que a substância P administrada no hipocampo dorsal, mas não no ventral, aumentou a atividade nos braços abertos do labirinto em cruz elevado e na zona central do campo aberto, sugerindo um efeito ansiolítico mediado por esta estrutura.

Muitos estudos têm demonstrado o papel importante das porções dorsal e/ou ventral do hipocampo no condicionamento aversivo, uma vez que este paradigma é fundamentado em aspectos emocionais do aprendizado associativo. Os primeiros resultados acerca da participação do hipocampo no aprendizado aversivo foram obtidos através de uma série de estudos que demonstraram que lesões eletrolíticas aplicadas ao hipocampo dorsal de ratos promoviam um prejuízo tanto na aquisição quanto na expressão do condicionamento aversivo. O condicionamento utilizado nestes trabalhos foi promovido pela associação entre um determinado ambiente (EC1) e choques elétricos nas patas (EI) (condicionamento contextual aversivo) (KIM; FANSELOW, 1992; PHILLIPS; LEDOUX, 1992; SELDEN et al., 1991). Estes trabalhos



relacionaram a importância do hipocampo dorsal no condicionamento contextual aversivo ao seu papel na memória espacial. Além disso, estes estudos observaram que o condicionamento de uma pista discreta como um som (EC1) associado a um estímulo aversivo como choque elétrico nas patas (EI) (condicionamento auditivo aversivo) não foi prejudicado pela lesão promovida no hipocampo dorsal. Desta forma, por muito tempo acreditou-se que o hipocampo dorsal seria um componente exclusivamente da circuitaria do condicionamento contextual aversivo. Contudo, trabalhos realizados inicialmente com coelhos observaram que lesões hipocâmpais promoviam um prejuízo no condicionamento aversivo promovido pela apresentação do EC e do EI temporalmente separados, num protocolo denominado condicionamento aversivo de traço (do inglês, *trace fear conditioning*) (KIM; CLARK; THOMPSON, 1995; MOYER; DEYO; DISTERHOF, 1990). Este protocolo difere do protocolo geralmente utilizado na análise do condicionamento aversivo com pistas discretas, condicionamento de atraso (do inglês, *delay fear conditioning*), onde o EI imediatamente sucede ou co-termina com o EC (SHORS et al., 2000). Quinn e colaboradores sugeriram que o condicionamento de traço é dependente do hipocampo, pois o EC é interpretado por esta estrutura como elemento do contexto e esta informação é mantida por um breve intervalo de tempo até a apresentação do EI (QUINN et al., 2002). Assim, utilizando o protocolo de condicionamento aversivo de traço em roedores, foi demonstrada a participação tanto da porção dorsal quanto da porção ventral do hipocampo neste tipo de aprendizado associativo (CZERNIAWSKI, YOON; OTTO, 2009; CZERNIAWSKI et al., 2012; MCECHRON et al., 1998; QUINN et al. 2002; QUINN et al, 2005). Em função de sua densa conectividade com núcleos amigdalares, a porção ventral do hipocampo parece exibir um papel mais amplo na produção de respostas aversivas do que o hipocampo dorsal (ANAGNOSTARAS; GALE; FANSELOW, 2001). Estudos relatam a participação da porção ventral do hipocampo não somente no condicionamento contextual aversivo (BAST, ZHANG, FELDON, 2001; CZERNIAWSKI et al., 2012; DONLEY; SCHULKIN; ROSEN, 2005; GONZALEZ-PARDO et al., 2012; HUNSAKER; KESNER, 2008; MAREN; HOLT, 2004; RAYBUCK; GOULD, 2010; RICHMOND et al., 1999; TRIVEDI; COOVER, 2004; ZHANG; BAST; FELDON, 2001) e condicionamento aversivo de traço (BURMAN; STARR; GEWIRTZ, 2006; CZERNIAWSKI et al., 2012; CZERNIAWSKI; YOON; OTTO, 2009; ESCLASSAN et al., 2009; GILMARTIN; KWAPIS; HELMSTETTER, 2012; RAYBUCK; GOULD, 2010; ROGERS; HUNSAKER; KESNER,

2006; TRIVEDI; COOVER, 2006; YOON; OTTO, 2007), mas também no condicionamento aversivo de atraso (BAST; ZHANG; FELDON, 2001; BURMAN; STARR; GEWIRTZ, 2006; ESCLASSAN et al., 2009; HUNSAKER; KESNER, 2008; MAREN; HOLT, 2004; SURRIA-MERCADO; PADILHA-COREANO; QUIRK, 2011; TRIVEDI; COOVER, 2004; ZHANG; BAST; FELDON, 2001). Desta forma, o hipocampo parece ser um importante elemento da circuitaria do condicionamento aversivo.

### **1.1.2 Os receptores glutamatérgicos subtipo NMDA e o Condicionamento Aversivo**

O glutamato é o principal neurotransmissor excitatório do sistema nervoso central. Os receptores de glutamato são classificados em ionotrópicos e metabotrópicos. Os receptores ionotrópicos são classificados de acordo com seus agonistas específicos:  $\alpha$ -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionato (AMPA), 2-carboxi-3-carboximetil-4-isopropenilpirrolidina (cainato) e N-metil-D-aspartato (NMDA) (KEW; KEMP, 2005).

Os receptores glutamatérgicos subtipo NMDA são formados a partir de sete tipos de subunidades, NR1, NR2A-D e NR3A e B, em combinações da subunidade NR1 com uma ou duas subunidades NR2 ou combinações da subunidade NR1 com ambas as subunidades NR2 e NR3. Contudo, a funcionalidade do receptor glutamatérgico subtipo NMDA depende de uma composição mínima de duas subunidades NR1 e duas subunidades NR2, uma vez que sua ativação depende de dois co-agonistas, glicina e glutamato, com sítios de ligação em NR1 e NR2, respectivamente. Outra peculiaridade dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA é o bloqueio do canal exercido pelo  $Mg^{2+}$  de forma voltagem-dependente (KEW; KEMP, 2005). Estudos de ligação mostraram que os receptores glutamatérgicos subtipo NMDA exibem uma distribuição heterogênea no encéfalo, com alta densidade no hipocampo, tálamo e córtex. Contudo, a maior densidade foi observada na região CA1 do hipocampo (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003). Está bem estabelecido na literatura que os receptores glutamatérgicos subtipo NMDA estão envolvidos em muitos processos funcionais, exibindo um papel chave tanto na aprendizagem e memória quanto na emocionalidade (BERGINK; MEGEN; WESTENBERG, 2004; RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003), assim, implicados também no processamento do condicionamento aversivo.

Um importante papel dos receptores NMDA no condicionamento aversivo é a indução de plasticidade sináptica em estruturas responsáveis pela codificação da associação aversiva, tais como amígdala e hipocampo (MAREN, 2001). A potencialização de longa duração (LTP, do inglês *long term potentiation*) é um fortalecimento da transmissão sináptica como consequência da forte ativação do receptor NMDA (BLISS; COLLINGRIDGE, 1993). A LTP foi primeiramente visualizada no hipocampo (BLISS; LOMO, 1973) e mais tarde foi observada também em sinapses amigdalares (CHAPMAN et al., 1990; CLUGNET; LEDOUX, 1990; MAREN; FANSELOW, 1995). A rápida indução e associatividade são propriedades da LTP fundamentais na codificação das memórias aversivas promovidas pelo condicionamento aversivo (FANSELOW, 1993; MAREN, 1999a; ROGAN; LEDOUX, 1996).

Estudos utilizando antagonistas dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no hipocampo dorsal observaram o papel destes receptores essencialmente na codificação de representações contextuais (BAST; ZHANG; FELDON, 2003; CZERNIAWSKI et al., 2012; QUINN et al., 2005; SCHENBERG; OLIVEIRA, 2008; YOUNG; BOHENEK; FANSELOW, 1994). Da mesma forma, foram observados prejuízos na formação do condicionamento contextual aversivo através do bloqueio dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no hipocampo ventral (CZERNIAWSKI et al., 2012; ZHANG, BAST, FELDON, 2001). Além da importância na formação da memória aversiva, outros trabalhos também demonstraram o papel dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo na expressão do condicionamento aversivo (CZERNIAWSKI et al., 2012; MELIK et al., 2006; QUINN et al., 2005).

### 1.1.3 O Condicionamento Olfatório Aversivo

Evidências clínicas demonstram que odores associados a um trauma específico, tais como o diesel em veteranos de guerra, podem precipitar a evocação de memórias emocionais e induzir a ocorrência de lembranças traumáticas em pacientes com TEPT (VERMETTEN et al., 2007).

A utilização de estímulos olfatórios é uma importante ferramenta no estudo do condicionamento aversivo, uma vez que memórias olfatórias são geralmente associadas a experiências emocionais (HERZ, 1997). A aplicação do condicionamento olfatório aversivo é vantajosa, sobretudo em roedores, uma vez que estes dependem essencialmente do

olfato para encontrar alimentos ou presas, identificação de indivíduos da mesma espécie, interação social, reprodução e detecção de predadores no ambiente (RESTREPO et al., 2004).

Trabalhos realizados neste laboratório demonstraram que a associação entre o odor de café (EC1) e cinco choques elétricos nas patas (EI), em roedores, foi capaz de ocasionar um conjunto de respostas defensivas quando os mesmos foram reapresentados ao odor condicionado. Ainda, o caráter aversivo do odor de café, adquirido durante a associação com o estímulo incondicionado, foi suficiente para promover o pareamento entre o estímulo olfatório condicionado (EC1) e o ambiente (EC2) onde este foi reexposto aos animais, propiciando um condicionamento contextual de segunda ordem (KROON; CAROBREZ, 2009). Estas respostas comportamentais foram similares àquelas exibidas por ratos confrontados com odor de gato (CANTERAS et al., 2008; DO MONTE et al., 2008). Adicionalmente, foi observado que a expressão do condicionamento olfatório aversivo recruta uma área hipotalâmica essencialmente ativada na presença do odor de predador, o PMd (CANTERAS et al., 2008). O PMd, o núcleo hipotalâmico anterior e a porção dorsomedial do núcleo ventromedial do hipotálamo compõem o SDHM (CANTERAS et al., 1997; CANTERAS, 2002). A ativação deste sistema está primariamente envolvida na expressão de respostas defensivas anti-predatórias. Estrategicamente, tal sistema está localizado com a função de organizar os processamentos neurais relacionados a pistas do predador e influenciar sítios do tronco encefálico responsáveis pela expressão das respostas defensivas frente ao predador (CANTERAS et al., 1997; CANTERAS, 2002). Estudos posteriores demonstraram que a ativação de adrenoceptores beta no PMd, na presença de um estímulo olfatório, foi capaz de promover a formação do condicionamento olfatório aversivo, agindo como EI (PAVESI; CANTERAS; CAROBREZ, 2011).

Desta forma, foi sugerido (CANTERAS et al., 2008; PAVESI; CANTERAS; CAROBREZ, 2011) que a codificação do condicionamento olfatório de medo recrutaria projeções da matéria cinzenta periaquedutal (MCP) via tálamo para áreas associativas corticais, hipocampo e amígdala. O hipocampo e a amígdala seriam fundamentais na codificação das informações contextuais e olfatórias e na formação da memória aversiva. A informação aversiva seria então enviada para o SDHM e MCP promovendo as respostas de medo. Confirmando a participação da MCP na formação do condicionamento olfatório de medo, um trabalho realizado neste laboratório demonstrou que a ativação glutamatérgica subtipo NMDA da coluna dorsolateral

desta estrutura foi capaz de promover o aprendizado aversivo agindo como estímulo incondicionado (KINCHESKI, 2011).

Com base na circuitaria do condicionamento olfatório aversivo inicialmente proposta por Canteras e colaboradores (2008) e nos inúmeros trabalhos que apontam as diferenças funcionais e anatômicas das porções que compõem o hipocampo, o presente estudo foi delineado para verificar a hipótese de que a ativação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA das porções dorsal e ventral do hipocampo desempenharia um papel funcional distinto no estabelecimento das diferentes etapas do condicionamento olfatório aversivo e do condicionamento de segunda ordem.



## 2. Objetivos

O objetivo geral do presente estudo foi avaliar o envolvimento da neurotransmissão glutamatérgica via receptores subtipo NMDA nas porções dorsal e ventral do hipocampo nas etapas de formação e expressão do condicionamento aversivo, utilizando o odor de acetato de amila como estímulo condicionado de primeira ordem, o choque elétrico nas patas como estímulo incondicionado e o contexto como estímulo condicionado de segunda ordem. Para alcançar o objetivo proposto as seguintes metas foram delineadas:

1. Verificar a participação dos receptores NMDA do glutamato no hipocampo dorsal ou ventral na formação do condicionamento olfatório aversivo;
2. Investigar a participação dos receptores NMDA do glutamato no hipocampo dorsal ou ventral na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na formação do condicionamento contextual de segunda ordem;
3. Avaliar a participação dos receptores NMDA do glutamato no hipocampo dorsal ou ventral na expressão do condicionamento contextual de segunda ordem;
4. Verificar o efeito da estimulação química dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no hipocampo dorsal ou ventral na formação do condicionamento olfatório aversivo.





### 3. Material e Métodos

#### 3.1 Animais

Foram utilizados ratos *Wistar* machos, fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal de Santa Catarina, pesando entre 300 e 380 g e com idade de 12 a 16 semanas. Estes animais foram aclimatizados no Biotério do Laboratório de Neurobiologia Comportamental ao menos uma semana antes do início do procedimento cirúrgico e ali mantidos até a finalização do protocolo comportamental. Foram dispostos em caixas plásticas, forradas com serragem, em grupos de 3-4 animais por caixa e mantidos em temperatura controlada ( $22\pm1^{\circ}\text{C}$ ), com ciclo claro-escuro de 12 horas (início da fase clara às 7:00 horas), tendo livre acesso à água e comida.

Todos os procedimentos conduzidos no presente estudo foram aprovados e realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética para o Uso de Animais da Universidade Federal de Santa Catarina (23080008789/2009-46).

#### 3.2 Cirurgia Estereotáxica

Todos os animais foram anestesiados com uma combinação de cloridrato de xilazina (2%; Xilanzin®; Syntec, Brasil) e quetamina (1,16 g/10 ml; Dopalen®; Ceva, Brasil) via intraperitoneal (3:2; 1,5 ml/kg). Após a perda dos reflexos, os animais foram cuidadosamente posicionados no aparelho esterotáxico (Insight Ltda; Brasil). Depois da tricotomia e assepsia com álcool iodado, foi realizada uma incisão longitudinal para a exposição da calota craniana e visualização do Bregma e do Lambda, pontos de intersecção entre as suturas coronal e sagital e lambdóide e sagital, respectivamente. Após a fixação de dois parafusos de aço inoxidável, foi realizada a implantação bilateral das cânulas-guia (13,0 mm) de acordo com as coordenadas do atlas estereotáxico para ratos (PAXINOS; WATSON, 1998) direcionadas para a região dorsal ou ventral do hipocampo. As coordenadas empregadas para a canulação do hipocampo dorsal foram: Antero-posterior (AP): -3,6 mm; Médio-lateral (ML):  $\pm 1,9$  mm e Dorso-ventral (DV): -2,0 mm. Para a canulação da região ventral do hipocampo foram utilizadas as seguintes coordenadas: AP: -5,3 mm; ML:  $\pm 5,2$  mm e DV: -5,0 mm. Uma vez implantadas as cânulas-guia, a superfície craniana foi recoberta com uma camada de acrílico auto polimerizante. Ainda, para evitar possíveis obstruções, foi inserido um fio de aço inoxidável

(mandril, n° 30, 13,0 mm) em cada cânula-guia. Imediatamente após a cirurgia, foi administrada, por via subcutânea (2,5 mg/kg; 0,2 ml), uma solução antipirética, analgésica e antiinflamatória de flunixinina meglumina (Banamine®; Schering-Plough, Brasil) e uma solução antibiótica de benzilpenicilina e estreptomicina (Pentabiótico®, Fort Dodge, Brasil) por via intramuscular (10 mg/kg; 0,2 ml). Após aproximadamente 7 dias de recuperação, os experimentos comportamentais foram iniciados.

### 3.3 Drogas e Soluções

As seguintes drogas ou soluções foram utilizadas neste trabalho:

- (±)-ácido-2-amino-5-fosfanopentanóico (AP5, TOCRIS, EUA): antagonista dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA;
- N-metil-D-aspartato (NMDA, TOCRIS, EUA): agonista dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA;
- Acetato de amila (Aldrich Chemical, EUA)

As concentrações de AP5 (6 e 24 nmol) e NMDA (100 e 200 pmol) foram baseadas em publicações prévias de trabalhos realizados neste laboratório (MORAES; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2008; NASCIMENTO HACKL; CAROBREZ, 2007). AP5 e NMDA foram dissolvidos em salina tamponada (PBS) 0,1 M.

Os grupos controles foram constituídos por animais tratados com PBS.

O acetato de amila foi utilizado como estímulo olfatório no protocolo de condicionamento olfatório aversivo. Foi utilizada a concentração de 5% de acetato de amila, através da diluição em propilenoglicol (Lafan Química Fina LTDA, Brasil).

### 3.4 Microinjeção Intrahipocampal

Para a microinjeção das soluções, foram utilizadas agulhas injetoras (14,5 mm para administração no hipocampo dorsal e 15,5 mm no hipocampo ventral) acopladas a uma microseringa (Hamilton, 5 µl) através de um tubo de polietileno (PE10). Uma bolha de ar entre a solução a ser injetada e água destilada permitiu a visualização e controle da infusão. O sistema foi posicionado numa bomba de infusão (Insight, modelo BI 2000) assegurando maior precisão da taxa e do volume de infusão aplicado em todos os animais. Após a remoção do mandril com o auxílio de um alicate, as agulhas injetoras foram inseridas nas cânulas-

guia e foi injetado um volume de 0,5  $\mu$ l de solução em cada hemisfério numa taxa de 0,6  $\mu$ l por minuto. As agulhas injetoras foram mantidas por mais 30 segundos posteriormente à microinjeção.

### 3.5. Equipamentos

Duas caixas diferentes foram utilizadas no protocolo de condicionamento olfatório aversivo, uma caixa de condicionamento e uma caixa de odor.

O pareamento EC1-EI foi realizado na caixa de condicionamento (Insight Ltda, Brasil), conforme figura 1. Confeccionada em alumínio, com exceção da parede frontal e tampa em acrílico transparente, esta caixa mede 50 x 26 x 35 cm. Seu assoalho é composto por grades eletrificadas distanciadas 1 cm entre si. Um sistema gerador de choques promove a emissão de impulsos elétricos regulados a partir de controladores de intensidade e tempo. No compartimento abaixo do piso gradeado, um papel filtro (4 x 4 cm) umedecido com 100 $\mu$ l de acetato de amila 5% serviu como estímulo olfatório a ser condicionado. Esta etapa do condicionamento olfatório aversivo foi realizada numa sala com intensidade alta de luz, aproximadamente 80 lux.

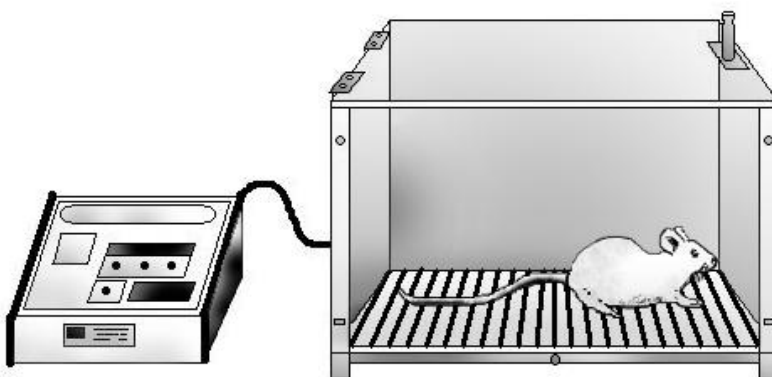


Figura 1. Esquema representativo da caixa de condicionamento.

A avaliação das respostas condicionadas foi realizada na caixa de odor, conforme figura 2. Dividida em dois compartimentos, um aberto (40 x 26 x 40 cm), sem cobertura, e um fechado (20 x 26 x 40 cm), com cobertura. A caixa de odor foi construída em acrílico preto com exceção

das paredes frontais, edificadas em acrílico transparente. Na parede divisória entre o compartimento fechado e o aberto, há uma pequena abertura (6 x 6 cm) que possibilita o trânsito do animal pelos dois ambientes da caixa. Um recipiente retangular confeccionado em acrílico transparente (6,5 x 1,0 x 7,0 cm), com a face frontal repleta de pequenos orifícios, contendo um papel filtro (4 x 4cm), embebido em 100 µl de acetato de amila 5%, fixado na parede lateral do compartimento aberto serviu como fonte do estímulo olfatório condicionado. Uma marcação no piso da caixa, localizada a 7 cm desta parede, delimita a área proximal à fonte de odor. A fim de reduzir influências contextuais em relação à etapa anterior do protocolo, a luminosidade da sala foi reduzida a apenas 4 lux.



Figura 2. Esquema representativo da caixa de odor.

### 3.6 Teste Comportamental: Condicionamento Olfatório Aversivo

No primeiro dia de experimentação, durante a sessão de familiarização, todos os animais foram colocados na caixa de condicionamento durante 4 minutos para livre exploração. No dia seguinte, durante a sessão de condicionamento, os animais voltaram para a caixa onde, após permanecerem por 40 segundos, receberam 0, 1 ou 5 choques elétricos (0,4 mA/2s, intervalo de 40 s entre cada choque) nas patas, conforme protocolo experimental (figura 3), na presença do estímulo olfatório (acetato de amila). A etapa de avaliação da resposta emocional condicionada, composta de três sessões com duração de dez minutos cada e intervalo de vinte e quatro horas, foi realizada na caixa de odor. Assim, no terceiro dia os animais foram ambientados na caixa de odor, numa sessão também denominada familiarização. Esta sessão

permitiu a avaliação do comportamento basal dos animais frente apenas ao ambiente novo. No dia seguinte, os animais foram reexpostos a caixa de odor na presença do estímulo olfatório condicionado (acetato de amila). Esta sessão foi denominada teste EC1, uma vez que o estímulo condicionado resultante da associação EC1 (odor de acetato de amila) + EI (choque elétrico nas patas) foi apresentado aos animais. No quinto dia, os animais foram novamente colocados na caixa de odor, mas como na sessão de familiarização, sem a presença do estímulo olfatório. Esta sessão objetivou avaliar o condicionamento contextual de segunda ordem promovido pela associação entre o contexto (EC2, caixa de odor) e o estímulo olfatório condicionado (EC1). Após o condicionamento de primeira ordem, o odor de acetato de amila adquire características aversivas capazes de promover uma segunda associação com um estímulo neutro. Esta última sessão foi, portanto, denominada teste EC2. O protocolo do condicionamento olfatório aversivo está representado na figura 3.

Uma solução de álcool (10 %) foi utilizada para a limpeza das caixas de condicionamento e de odor entre a passagem de cada animal.

As sessões foram registradas através de um sistema de vídeo-câmera.

## Protocolo Experimental

### Formação do Condicionamento Olfatório Aversivo



### Expressão do Condicionamento Olfatório Aversivo



Figura 3. Diagrama esquemático representando o protocolo experimental do condicionamento olfatório aversivo. Adaptado de KROON; CAROBREZ, 2009.

### 3.7 Comportamentos defensivos avaliados

Com base em experimentos prévios realizados neste laboratório (CANTERAS et al., 2008; CAVALLI; BERTOGLIO; CAROBREZ, 2009; KROON; CAROBREZ, 2009; PAVESI; CANTERAS; CAROBREZ, 2011), os seguintes parâmetros comportamentais foram avaliados na caixa de odor e caracterizados como resposta emocional condicionada:

- Tempo de aproximação: tempo em que o animal permanece com ao menos a cabeça próxima do recipiente contendo o papel filtro embebido ou não em acetato de amila. A marcação no chão da caixa auxilia a medida deste parâmetro.
- Tempo escondido: tempo em que o animal permanece inteiramente dentro do compartimento fechado da caixa.
- Tempo de *Head-out*: caracterizado como comportamento de avaliação de risco, onde o animal permanece no compartimento fechado e com a cabeça para fora deste compartimento direcionada para o recipiente contendo o papel filtro.

### 3.8 Protocolos Experimentais

#### 3.8.1 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo na formação do condicionamento olfatório aversivo

Esta etapa foi realizada a fim de avaliar o papel dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo na formação do condicionamento olfatório aversivo. Esta etapa foi dividida em dois experimentos (experimento 1 e experimento 2).

No experimento 1, durante o primeiro dia do protocolo experimental, os animais foram colocados na caixa de condicionamento para explorarem o aparato durante 4 minutos. No dia seguinte, os ratos foram aleatoriamente divididos para receberem PBS ou AP5 (antagonista dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA) nas doses de 6 ou 24 nmol no hipocampo dorsal.

Dez minutos após a microinjeção, os animais foram colocados na caixa de condicionamento onde foram emitidos 5 choques elétricos (EI) (0,4 mA/2s, intervalo de 40 segundos) nas patas na presença do odor de acetato de amila (EC1). A avaliação da resposta emocional condicionada foi realizada na caixa de odor através das sessões de

familiarização (Dia 3), teste EC1 (Dia 4) e teste EC2 (dia 5), conforme descrito no item 3.6.

No experimento 2, os animais foram aleatoriamente divididos para receberem PBS ou AP5 (6 ou 24 nmol) no hipocampo ventral e dez minutos após a microinjeção foram submetidos ao pareamento entre os choques elétricos nas patas e o odor de acetato de amila. A sessão de condicionamento, assim como a avaliação da resposta emocional condicionada na caixa de odor foi realizada conforme o protocolo descrito para o experimento 1.

### **3.8.2 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na formação do condicionamento contextual de segunda ordem**

Esta etapa foi realizada para verificar o papel do antagonista dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA (AP5) no hipocampo na expressão da resposta emocional condicionada ao odor e na formação do condicionamento contextual de segunda ordem entre o odor condicionado e seu contexto de exposição. Esta etapa foi dividida em dois experimentos (experimento 3 e 4).

No experimento 3, no dia seguinte à familiarização (Dia1), os animais foram submetidos à sessão de condicionamento (Dia 2) com a emissão de 5 choques elétricos nas patas na presença do odor de acetato de amila, conforme descrito no experimento 1. No dia 3, os animais foram colocados na caixa de odor, na ausência do estímulo olfatório, para livre exploração durante 10 minutos, na sessão de familiarização. No dia seguinte, os animais foram aleatoriamente divididos para receber PBS ou AP5 nas doses de 6 ou 24 nmol no hipocampo dorsal. Dez minutos após a microinjeção, os animais foram colocados na caixa de odor na presença do odor de acetato de amila na sessão de teste EC1. No dia 5, teste EC2, os ratos foram novamente colocados na caixa de odor, contudo sem a presença do estímulo olfatório condicionado. O teste EC2 foi realizado com o objetivo de verificar se o bloqueio dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA promovido pelo AP5 durante o teste EC1 seria capaz de prejudicar a formação da associação entre o odor condicionado (EC1) e o contexto (EC2, caixa de odor), interferindo com a formação do condicionamento contextual de segunda ordem.

O protocolo realizado no experimento 4 foi semelhante ao conduzido no experimento 3, contudo no dia 4, antes da sessão de teste EC1, os animais foram aleatoriamente divididos para receberem PBS ou AP5 nas doses de 6 ou 24 nmol no hipocampo ventral.

### **3.8.3 Efeito da infusão de AP5 no hipocampo na expressão do condicionamento contextual de segunda ordem**

Esta etapa foi realizada para verificar o papel do antagonista dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA (AP5) no hipocampo na expressão da resposta emocional condicionada ao contexto de exposição do odor condicionado. Esta etapa foi dividida em dois experimentos (experimento 5 e 6).

No experimento 5, 24 horas após a sessão de familiarização na caixa de condicionamento (Dial), os animais foram submetidos ao pareamento entre choques elétricos nas patas e o odor de acetato de amila, conforme descrito no experimento 1. No dia 3, os animais foram colocados na caixa de odor, na ausência do estímulo olfatório, para livre exploração durante 10 minutos, na sessão de familiarização. No dia 4, durante o teste EC1, os ratos foram colocados na caixa de odor na presença do odor de acetato de amila. No dia seguinte, os animais foram aleatoriamente divididos para receberem PBS ou AP5 na dose de 24 nmol no hipocampo dorsal. Dez minutos após a microinjeção, durante o teste EC2, os ratos foram novamente colocados na caixa de odor, contudo sem a presença do estímulo olfatório condicionado. O teste EC2 foi conduzido com o objetivo de verificar se o bloqueio dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA promovido pelo AP5 durante o teste EC2 seria capaz de prejudicar a expressão das respostas defensivas ao contexto condicionado (EC2), interferindo com a expressão do condicionamento contextual de segunda ordem.

O experimento 6 foi conduzido de acordo com o protocolo descrito para o experimento 5. Contudo, no dia 5, antes da sessão de teste EC2, os animais foram aleatoriamente divididos para receberem PBS ou AP5 na dose de 24 nmol no hipocampo ventral.

### **3.8.4 Efeito da estimulação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo no condicionamento olfatório aversivo**

Esta etapa teve como objetivo avaliar o papel do NMDA (agonista dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA) no hipocampo na formação do condicionamento olfatório aversivo. Esta etapa foi dividida em quatro experimentos (experimento 7.1, experimento 8.1, experimento 7.2 e experimento 8.2).

O experimento 7.1 teve como objetivo verificar se estimulação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo dorsal, através do tratamento com agonista, poderia atuar como estímulo



incondicionado e promover o condicionamento olfatório aversivo quando pareado ao odor de acetato de amila. Neste protocolo, vinte e quatro horas após a sessão de familiarização na caixa de condicionamento, os animais foram aleatoriamente divididos para receberem PBS ou NMDA (100 ou 200 pmol) no hipocampo dorsal. Imediatamente após a microinjeção, os ratos foram colocados na caixa de condicionamento na presença do odor de acetato de amila durante 10 minutos. A avaliação da resposta emocional condicionada ao odor (EC1) e ao contexto (EC2) foi realizada na caixa de odor através das sessões de familiarização, teste EC1 e teste EC2, conforme previamente delineado no item 3.6.

O experimento 8.1 foi conduzido de acordo com o protocolo descrito para o experimento 7.1. Contudo, no dia 2, antes da sessão de condicionamento, os animais foram aleatoriamente divididos para receberem PBS ou NMDA nas doses de 100 ou 200 pmol no hipocampo ventral e imediatamente colocados na caixa de condicionamento na presença do odor de acetato de amila durante 10 minutos.

Para verificar se estimulação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no hipocampo dorsal logo após um treino fraco poderia potencializar esta memória aversiva e promover o condicionamento olfatório aversivo, o experimento 7.2 foi conduzido. Neste protocolo experimental, no dia seguinte à sessão de familiarização (Dia 1), os animais foram recolocados na caixa de condicionamento e submetidos a um protocolo de treino fraco, onde apenas um choque elétrico (0,4 mA/2s) nas patas foi emitido na presença do odor de acetato de amila. Trabalhos prévios deste laboratório já demonstraram que são necessários 5 choques elétricos nas patas para a promoção de respostas condicionadas aversivas e que apenas um choque não é capaz de promover estes comportamentos defensivos (KROON; CAROBREZ, 2009; SOUZA, 2011). Imediatamente após a sessão de treino fraco, os animais foram aleatoriamente divididos para receberem PBS ou NMDA nas doses de 100 ou 200 pmol no hipocampo dorsal. Após a microinjeção, os ratos voltaram para suas caixas moradia e retornaram para o biotério. A avaliação das respostas condicionadas ao odor e ao contexto foi conduzida na caixa de odor durante as sessões de familiarização (Dia 3), teste EC1 (Dia 4) e teste EC2 (Dia 5), conforme descrito no item 3.6.

O protocolo realizado no experimento 8.2 foi semelhante ao conduzido no experimento 7.2, contudo no dia 2, imediatamente após a sessão de treino fraco, os animais foram aleatoriamente divididos para

receberem PBS ou NMDA nas doses de 100 ou 200 pmol no hipocampo ventral.

### **3.9 Perfusão e Histologia**

Após a conclusão dos procedimentos experimentais, os animais foram anestesiados (cloridrato de xilazina + quetamina, nas doses previamente mencionadas) e, em seguida, microinjetados com corante azul de Evans (0,5 %; Sigma, EUA), semelhante à microinjeção das soluções de AP5, NMDA ou PBS no hipocampo dorsal ou ventral. Posteriormente, os animais foram perfundidos, via intracardíaca, com solução salina (0,9 %; Cloreto de Sódio P.A.; LabSynth Produtos para Laboratório LTDA, Brasil) seguida por uma solução de formaldeído (10 %; Formaldeído 37 %, Cromato Produtos Químicos LTDA, Brasil). Os encéfalos foram removidos e mantidos em solução de formaldeído por aproximadamente 48 horas e, posteriormente, transferidos para uma solução de sacarose (30 %, Sacarose P.A., Lafan Química Fina LTDA, Brasil) por no mínimo 24 horas antes de serem cortados. Os encéfalos foram cortados em um criostato (Leica, modelo CM 1850, Microsystems AG, Alemanha) em secções de 50 µm de espessura. Em seguida, os cortes foram montados para microscopia em lâminas de vidro previamente gelatinizadas. Com o auxílio de um estereoscópio (Metrimpex, Hungria), os sítios de injeção marcados pelo corante azul de Evans foram identificados e analisados através da comparação com o atlas para ratos de Paxinos e Watson (1998), conforme figura 4. Após a secagem, as lâminas foram lavadas e hidratadas com água destilada, tratadas com corante Giemsa (Sigma-Aldrich, EUA), soluções de álcoois (Álcool Etílico Absoluto P.A.; LabSynth Produtos para Laboratório LTDA, Brasil) em concentrações crescentes, fixadas com Citrisolv® (Fisherbrand, EUA) e, por fim, cobertas com lamínulas.

Somente dados obtidos a partir de animais com sítio de microinjeção bilateral no hipocampo dorsal ou ventral foram incluídos na análise estatística.

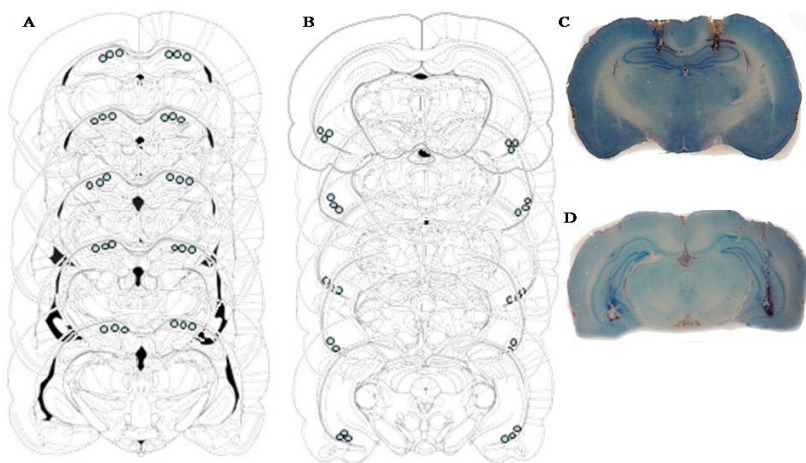


Figura 4. Esquema representativo de cortes coronais de encéfalo de rato mostrando os sítios de microinjeção no hipocampo dorsal (A; distância do bregma 3,14-4,16 mm) e no hipocampo ventral (B; distância do bregma 4,8-5,8 mm), de acordo com os diagramas do atlas de Paxinos e Watson (1998). C e D. Fotomicrografias de cortes coronais corados com Giemsa na região dorsal e ventral, respectivamente.

### 3.10 Análise Estatística

Os parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de *head-out* foram considerados variáveis dependentes, ao passo que o tratamento foi considerado a variável independente.

A normalidade dos resultados foi avaliada pelo teste *Shapiro-Wilk* ao nível de significância de 5% ( $p > 0,05$ ).

Os dados obtidos durante a sessão de familiarização foram analisados por Análise de Variância (ANOVA) de uma via. Os valores foram agrupados e representados como média  $\pm$  95% do intervalo de confiança.

Os dados coletados nas sessões de teste EC1 e teste EC2 foram analisados através ANOVA para medidas repetidas e representados como média  $\pm$  erro padrão da média (e.p.m.). Nos casos em que a ANOVA revelou valores significativos, os dados foram submetidos ao teste *post hoc Newman-Keuls*. Os fatores analisados pela ANOVA de medidas repetidas foram o tratamento e a repetição, fator que compara a similaridade dos valores obtidos durante a sessão de teste EC1 com os dados obtidos durante a sessão de teste EC2.

A análise dos dados obtidos no presente estudo foi realizada com o auxílio do programa estatístico Statistica® (versão 10.1; StatSoft®, EUA) e a representação dos gráficos através do programa Prisma® (versão 5.0; GraphPad®, EUA).

Um valor de  $p$  inferior a 0,05 foi considerado significativo.

## 4. Resultados

### 4.1 *Experimento 1: Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal na formação do condicionamento olfatório aversivo*

A figura 5 ilustra o efeito da microinjeção de PBS ou AP5 (6 ou 24 nmol) no hipocampo dorsal na formação do condicionamento olfatório aversivo.

Os ratos que receberam PBS ou AP5 nas doses de 6 ou 24 nmol dez minutos antes da sessão de condicionamento não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros analisados durante a sessão de familiarização na caixa de odor.

Nas sessões de teste EC1 e EC2, a ANOVA para os parâmetros % de tempo de aproximação e % de tempo escondido detectou efeito significativo no fator tratamento [ $F(2,16) = 6,685$ ,  $p = 0,008$ ;  $F(2,16) = 5,021$ ,  $p = 0,020$ ], mas não no fator repetição [ $F(1,16) = 0,278$ ,  $p = 0,605$ ;  $F(1,16) = 0$ ,  $p = 0,990$ ] e na interação entre o tratamento e a repetição [ $F(2,16) = 1,028$ ,  $p = 0,380$ ;  $F(2,16) = 0,208$ ;  $p = 0,814$ ]. Ainda, não foram detectadas diferenças significativas no fator tratamento [ $F(2,16) = 2,810$ ,  $p = 0,090$ ], no fator repetição [ $F(1,16) = 0$ ,  $p = 0,997$ ] e na interação entre o tratamento e a repetição [ $F(2,16) = 0,209$ ,  $p = 0,813$ ] para o parâmetro tempo de *head-out*. A análise *post hoc* revelou que os animais tratados com AP5 6 e 24 nmol no hipocampo dorsal aumentaram o tempo de aproximação à fonte de odor e reduziram o tempo escondido no compartimento fechado, nas sessões de teste EC1 e EC2, quando comparados ao grupo controle PBS.

Estes resultados demonstraram que o antagonismo dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no hipocampo dorsal foi capaz de interferir com a formação do condicionamento olfatório aversivo.

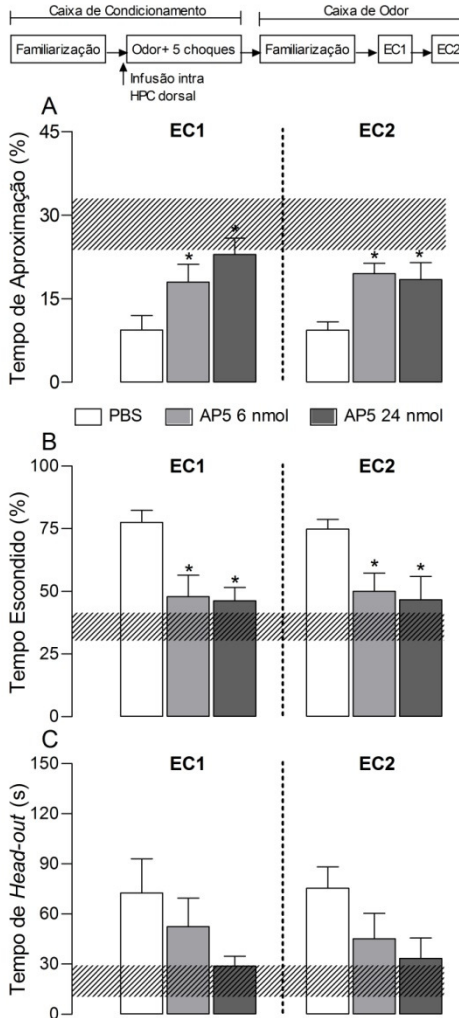


Figura 5. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal na formação do condicionamento olfatório aversivo. Os animais receberam PBS, AP5 6 ou AP5 24 nmol no HPCd e, após 10 minutos, foram submetidos à sessão de condicionamento (odor+5 choques). As colunas representam a média + e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head-out* (C) durante as sessões de teste EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. \* $p < 0,05$  comparado ao grupo PBS. ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls ( $n=5-7$ ).

#### **4.2 Experimento 2: Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral na formação do condicionamento olfatório aversivo**

A ANOVA não detectou diferenças significativas na sessão de familiarização na caixa de odor entre os grupos que receberam PBS ou AP5 (6 ou 24 nmol) no hipocampo ventral antes da sessão de condicionamento.

Nas sessões teste EC1 e teste EC2, diferenças significativas foram detectadas através da ANOVA no fator repetição para a % de tempo escondido [ $F(1,17)= 5,358$ ,  $p= 0,033$ ], mas não no fator tratamento [ $F(2,17)= 0,084$ ,  $p= 0,920$ ] e na interação entre o tratamento e a repetição [ $F(2,17)= 0,211$ ,  $p= 0,811$ ]. Ainda, não foram detectadas diferenças significativas no fator tratamento [ $F(2,17)= 0,340$ ,  $p= 0,716$ ;  $F(2,17)= 0,534$ ,  $p= 0,596$ ], no fator repetição [ $F(1,17)= 4,106$ ,  $p= 0,059$ ;  $F(1,17)= 0,915$ ,  $p= 0,352$ ] e na interação entre o tratamento e a repetição [ $F(2,17)= 0,473$ ,  $p= 0,631$ ;  $F(2,17)= 0,878$ ,  $p= 0,434$ ] para os parâmetros % de tempo de aproximação e tempo de *head-out*.

Embora tenha sido observada uma diferença estatística nos valores de tempo escondido entre as sessões de teste EC1 e EC2, tanto o grupo controle PBS quanto os grupos tratados com AP5 (6 nmol ou 24 nmol) exibiram um aumento da % de tempo escondido no compartimento fechado durante a sessão de teste EC2. Esta diferença estatística não foi determinante para revelar o efeito do bloqueio dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no hipocampo ventral sobre a formação do condicionamento olfatório aversivo, conforme observado na figura 6.

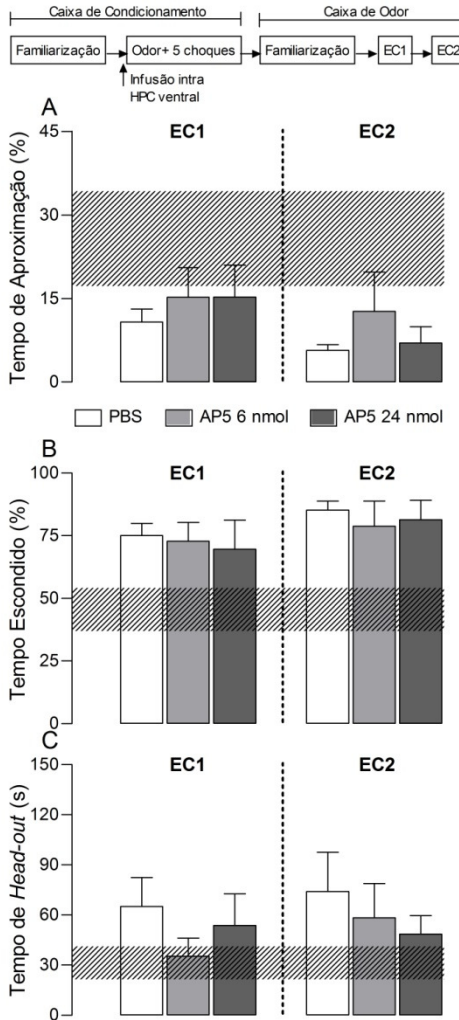


Figura 6. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral na formação do condicionamento olfatório aversivo. Os animais receberam PBS, AP5 6 ou AP5 24 nmol no HPCv e, após 10 minutos, foram submetidos à sessão de condicionamento (odor+5 choques). As colunas representam a média + e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head-out* (C) durante as sessões de teste EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls ( $n=5-8$ ).



### **4.3 Experimento 3: Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na formação do condicionamento contextual de segunda ordem**

A figura 7 representa o efeito da microinjeção de PBS ou AP5 (6 ou 24 nmol) no hipocampo dorsal na expressão de comportamentos defensivos frente ao odor condicionado e na formação do condicionamento contextual de segunda ordem.

Os animais que receberam PBS ou AP5 nas doses de 6 ou 24 nmol dez minutos antes da sessão de teste EC1 não apresentaram diferenças significativas nos parâmetros analisados durante a sessão de familiarização na caixa de odor.

Nas sessões de teste EC1 e EC2, a ANOVA para os parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de *head-out* detectou diferenças significativas no fator tratamento [ $F(2,17)= 5,577$ ,  $p= 0,014$ ;  $F(2,17)= 9,098$ ,  $p=0,002$ ;  $F(2,17)= 4,457$ ,  $p= 0,028$ ], mas não no fator repetição [ $F(1,17)= 0,235$ ,  $p= 0,634$ ;  $F(1,17)= 0,109$ ,  $p=0,745$ ;  $F(1,17)= 0,293$ ,  $p= 0,595$ ] e na interação entre o tratamento e a repetição [ $F(2,17)= 0,961$ ,  $p= 0,402$ ;  $F(2,17)= 0,377$ ,  $p=0,692$ ;  $F(2,17)= 1,643$ ,  $p= 0,223$ ].

A análise *post hoc* revelou um aumento significativo na % de tempo de aproximação, bem como uma redução na % de tempo escondido e tempo de *head-out* nos grupos microinjetados com AP5 6 e 24 nmol em relação ao grupo microinjetado com PBS durante a sessão de teste EC1. Na sessão de teste EC2, o tempo de aproximação continuou aumentado e o tempo escondido e de *head-out* diminuídos para os grupos que receberam AP5 (6 e 24 nmol) antes do teste EC1.

Estes resultados demonstraram que o antagonismo dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no hipocampo dorsal foi capaz de interferir com a expressão da resposta emocional condicionada ao odor, bem como prejudicar o condicionamento de segunda ordem ao contexto de exposição ao odor.

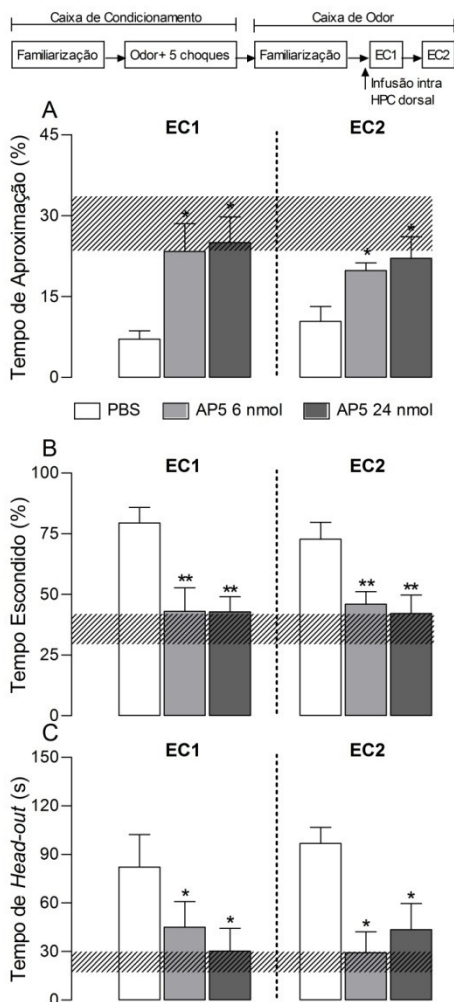


Figura 7. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na formação do condicionamento contextual de segunda ordem. Os animais receberam PBS, AP5 6 ou AP5 24 nmol no HPCd e, após 10 minutos, foram submetidos à sessão de teste EC1. As colunas representam a média + e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head-out* (C) durante as sessões de teste EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$  comparado ao grupo PBS. ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls ( $n=6-8$ ).

#### **4.4 Experimento 4: Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na formação do condicionamento contextual de segunda ordem**

Neste protocolo experimental, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos PBS, AP5 6 nmol e AP5 24 nmol durante a etapa de familiarização na caixa de odor.

Nas etapas de teste EC1 e teste EC2, a ANOVA para os parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de *head-out* detectou diferenças significativas no fator tratamento [ $F(2,20)= 27,92$ ,  $p < 0,001$ ;  $F(2,20)= 29,63$ ,  $p < 0,001$ ;  $F(2,20)= 4,890$ ,  $p = 0,019$ ], mas não no fator repetição [ $F(1,20)= 0,13$ ,  $p = 0,719$ ;  $F(1,20)= 0,59$ ,  $p = 0,451$ ;  $F(1,20)= 0,032$ ,  $p = 0,860$ ] e na interação entre o tratamento e a repetição [ $F(2,20)= 0,67$ ,  $p = 0,524$ ;  $F(2,20)= 0,10$ ,  $p = 0,908$ ;  $F(2,20)= 0,568$ ,  $p = 0,576$ ].

A análise *post hoc* revelou que o grupo que recebeu AP5 24 nmol antes do teste EC1, quando comparado ao grupo microinjetado com PBS, exibiu um aumento significativo na % de tempo de aproximação e uma redução na % de tempo escondido e tempo de *head-out* durante a sessão de teste EC1. No teste EC2, a % de tempo de aproximação continuou aumentada e a % de tempo escondido e tempo de *head-out* continuaram reduzidos para os animais que receberam AP5 24 nmol no hipocampo ventral antes do teste EC1. O grupo que recebeu AP5 6 nmol no hipocampo ventral antes do teste EC1 não apresentou diferenças significativas para os parâmetros analisados no teste EC1 e EC2 em relação ao grupo PBS (figura 8).

Estes resultados demonstraram que o tratamento com doses maiores de antagonista dos receptores glutamatérgicos NMDA no hipocampo ventral prejudicou a expressão das respostas defensivas condicionadas ao odor e interferiu na formação da associação (EC1-EC2), prejudicando também o condicionamento contextual de segunda ordem.

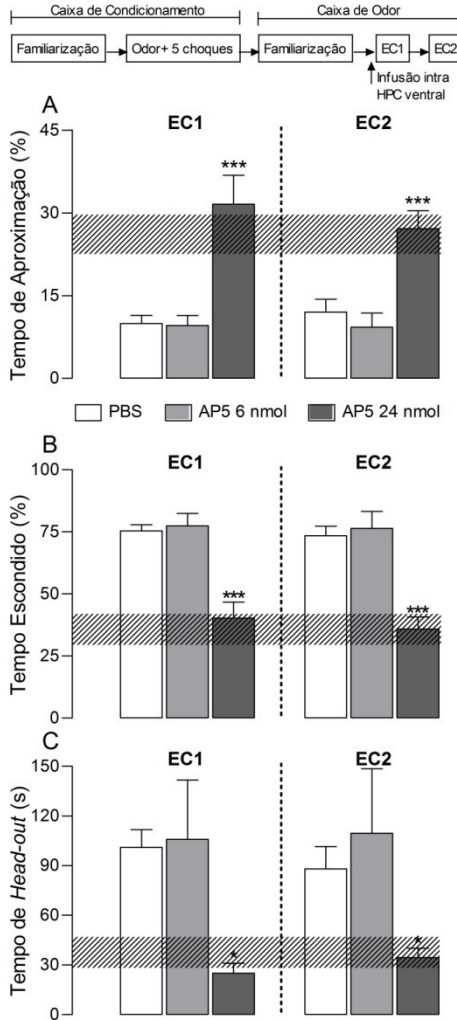


Figura 8. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na formação do condicionamento contextual de segunda ordem. Os animais receberam PBS, AP5 6 ou AP5 24 nmol no HPCv e, após 10 minutos, foram submetidos à sessão de teste EC1. As colunas representam a média + e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head-out* (C) durante as sessões de teste EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$  comparado ao grupo PBS. ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls ( $n = 6-10$ ).

#### **4.5 Experimento 5: Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal na expressão do condicionamento contextual de segunda ordem**

A ANOVA não detectou diferenças significativas entre os grupos (PBS ou AP5 24 nmol) durante a etapa de familiarização na caixa de odor.

Nas etapas de teste EC1 e EC2, a ANOVA para os parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de *head-out* não detectou diferenças significativas no fator tratamento [ $F(1,16)=1,695$ ,  $p=0,211$ ;  $F(1,16)=1,334$ ,  $p=0,265$ ;  $F(1,16)=0,353$ ,  $p=0,561$ ], no fator repetição [ $F(1,16)=0,350$ ,  $p=0,562$ ;  $F(1,16)=1,079$ ,  $p=0,314$ ;  $F(1,16)=0,509$ ,  $p=0,486$ ] e na interação entre o tratamento e a repetição [ $F(1,16)=0,513$ ,  $p=0,484$ ;  $F(1,16)=0,022$ ,  $p=0,885$ ;  $F(1,16)=0,152$ ,  $p=0,702$ ] entre os ratos que receberam PBS ou AP5 24 nmol no hipocampo dorsal antes do teste EC2 (figura 9).

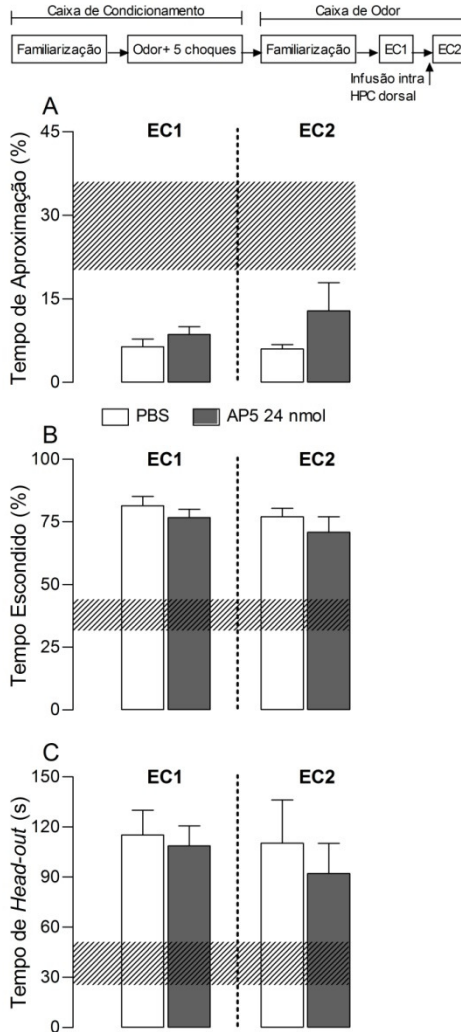


Figura 9. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo dorsal na expressão do condicionamento contextual de segunda ordem. Os animais receberam PBS ou AP5 24 nmol no HPCd e, após 10 minutos, foram submetidos à sessão de teste EC2. As colunas representam a média + e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head-out* (C) durante as sessões de teste EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. ANOVA de medidas repetidas ( $n=7-11$ ).

#### **4.6 Experimento 6: Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral na expressão do condicionamento contextual de segunda ordem**

Não foram detectadas diferenças estatísticas entre os grupos PBS ou AP5 24 nmol durante a sessão de familiarização na caixa de odor.

Nas etapas de teste EC1 e EC2, a ANOVA para os parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de *head-out* não detectou diferenças significativas no fator tratamento [ $F(1,11)=3,631$ ,  $p=0,083$ ;  $F(1,11)=2,274$ ,  $p=0,160$ ;  $F(1,11)=2,095$ ,  $p=0,176$ ], no fator repetição [ $F(1,11)=1,214$ ,  $p=0,294$ ;  $F(1,11)=2,068$ ,  $p=0,178$ ;  $F(1,11)=2,422$ ,  $p=0,148$ ] e na interação entre o tratamento e a repetição [ $F(1,11)=2,268$ ,  $p=0,160$ ;  $F(1,11)=3,264$ ,  $p=0,098$ ;  $F(1,11)=0,865$ ,  $p=0,372$ ] entre os ratos que receberam PBS ou AP5 24 nmol no hipocampo ventral antes do teste EC2 (figura 10).

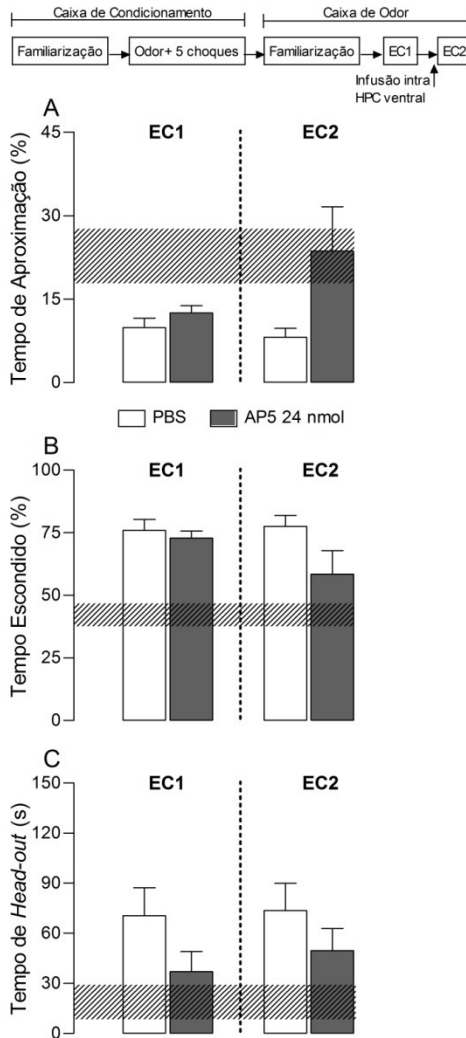


Figura 10. Efeito da infusão de AP5 no hipocampo ventral na expressão do condicionamento contextual de segunda ordem. Os animais receberam PBS ou AP5 24 nmol no HPCv e, após 10 minutos, foram submetidos à sessão de teste EC2. As colunas representam a média + e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head-out* (C) durante as sessões de teste EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. ANOVA de medidas repetidas ( $n=6-7$ ).



## **4.7 Experimento 7: Efeito da estimulação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo dorsal no condicionamento olfatório aversivo**

### **4.7.1 Experimento 7.1: Efeito da infusão de NMDA no hipocampo dorsal na formação do condicionamento olfatório aversivo**

No experimento 7.1, no segundo dia do protocolo experimental, os animais receberam PBS ou NMDA nas doses de 100 ou 200 pmol no hipocampo dorsal e foram imediatamente colocados na caixa de condicionamento na presença do odor de acetato de amila durante 10 minutos.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos PBS ou NMDA na etapa de familiarização na caixa de odor.

Nas sessões de teste EC1 e teste EC2, a ANOVA detectou diferenças significativas entre os grupos no fator repetição para o parâmetro tempo de *head-out* [ $F(1,23)= 4,990$ ,  $p= 0,036$ ], mas não no fator tratamento [ $F(2,23)= 0,141$ ,  $p= 0,869$ ] e na interação entre o tratamento e a repetição [ $F(2,23)= 0,652$ ,  $p= 0,530$ ]. Ainda, não foram detectadas diferenças significativas no fator tratamento [ $F(2,23)= 1,974$ ,  $p= 0,162$ ;  $F(2,23)= 0,064$ ,  $p= 0,938$ ], no fator repetição [ $F(1,23)= 0,070$ ,  $p= 0,794$ ;  $F(1,23)= 1,972$ ,  $p= 0,174$ ] e na interação entre o tratamento e a repetição [ $F(2,23)= 0,661$ ,  $p= 0,526$ ;  $F(2,23)= 1,525$ ,  $p= 0,239$ ] para os parâmetros % de tempo de aproximação e % de tempo escondido.

Embora tenha sido observada uma diferença estatística no tempo de *head-out* entre a sessão de teste EC1 e EC2, esta diferença não foi detectada no fator tratamento. Foi revelado um aumento no tempo de *head-out* no teste EC2 comparado ao teste EC1 para o grupo que recebeu PBS, assim como para os grupos que receberam NMDA (100 ou 200 pmol) antes da sessão de condicionamento. Assim, embora diferenças significativas tenham sido reveladas, estas não foram suficientes para demonstrar que a estimulação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no hipocampo dorsal, nas doses utilizadas, seria capaz de agir como estímulo incondicionado na promoção do condicionamento olfatório aversivo, conforme figura 11.

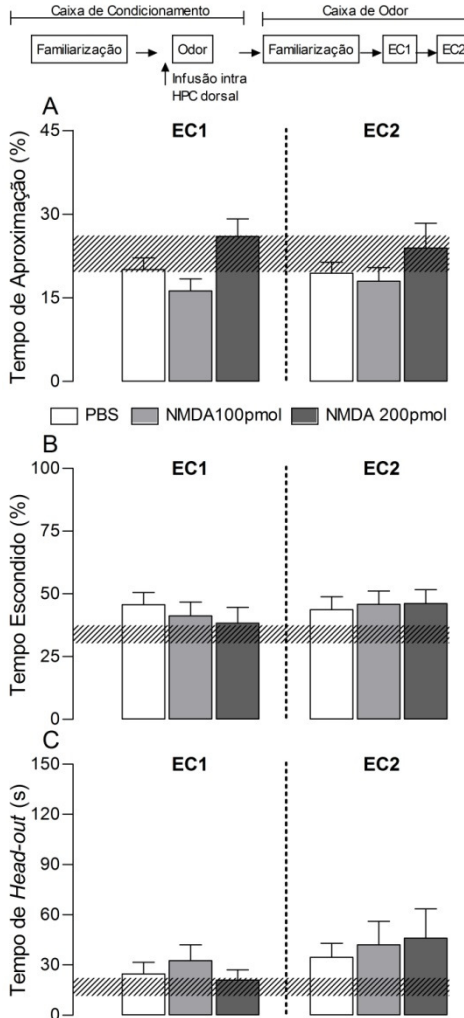


Figura 11. Efeito da infusão de NMDA no hipocampo dorsal na formação do condicionamento olfatório aversivo. Os animais receberam PBS, NMDA 100 ou NMDA 200 pmol no HPCd e foram imediatamente colocados na caixa de condicionamento na presença do odor de acetato de amila. As colunas representam a média + e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head-out* (C) durante as sessões de teste EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls ( $n=7-10$ ).

#### 4.7.2 Experimento 7.2: Efeito da infusão de NMDA no hipocampo dorsal na potencialização do condicionamento olfatório aversivo

No experimento 7.2, durante a sessão de condicionamento, os animais foram submetidos a um protocolo de treino fraco, onde somente um choque elétrico nas patas (0,4mA/2s) foi aplicado na presença do odor de acetato de amila. Imediatamente após esta sessão, os animais receberam PBS ou NMDA (100 ou 200 pmol) no hipocampo dorsal. Na etapa de familiarização na caixa de odor, não foram detectadas diferenças significativas entre os ratos que receberam PBS ou NMDA (100 ou 200 pmol), imediatamente após a sessão de treino fraco.

Nas sessões de teste EC1 e teste EC2, a ANOVA para os parâmetros % de tempo de aproximação e % de tempo escondido detectou diferenças significativas no fator tratamento [ $F(2,19)= 8,442$ ,  $p=0,003$ ;  $F(2,19)= 25,51$ ,  $p< 0,001$ ], mas não no fator repetição [ $F(1,19)= 0,653$ ,  $p=0,430$ ;  $F(1,19)= 0,23$ ,  $p= 0,637$ ] e na interação entre o tratamento e a repetição [ $F(2,19)= 0,404$ ,  $p=0,673$ ;  $F(2,19)= 0,81$ ,  $p= 0,461$ ]. A análise *post hoc* revelou uma redução significativa da % de tempo de aproximação e uma elevação da % de tempo escondido nos grupos microinjetados com NMDA 100 ou 200 pmol, quando comparados ao grupo controle PBS, durante as sessões de teste EC1 e EC2, conforme figura 12. Ainda, foram detectadas diferenças significativas no fator tratamento e interação entre os fatores tratamento e repetição para o parâmetro tempo de *head-out* [ $F(2,19)= 9,940$ ,  $p=0,001$ ;  $F(2,19)=3,588$ ;  $p=0,048$ ], mas não no fator repetição [ $F(1,19)= 0,671$ ,  $p=0,423$ ]. Comparações *post hoc* revelaram uma elevação significativa do comportamento de avaliação de risco no grupo que recebeu NMDA 100 pmol quando comparado ao grupo que recebeu PBS durante o teste EC1 e no grupo 200 pmol quando comparado ao grupo PBS durante o teste EC2.

O conjunto de respostas defensivas observado na sessão de teste EC1 demonstrou que a estimulação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo dorsal é capaz de promover a formação do condicionamento olfatório aversivo quando um protocolo de treino fraco é previamente utilizado. O caráter aversivo adquirido durante a sessão de condicionamento foi capaz de estabelecer uma nova associação durante a sessão de teste EC1 entre o odor condicionado e o seu contexto de exposição. Este evento promoveu a formação do condicionamento contextual de segunda ordem, conforme representado na figura 12.

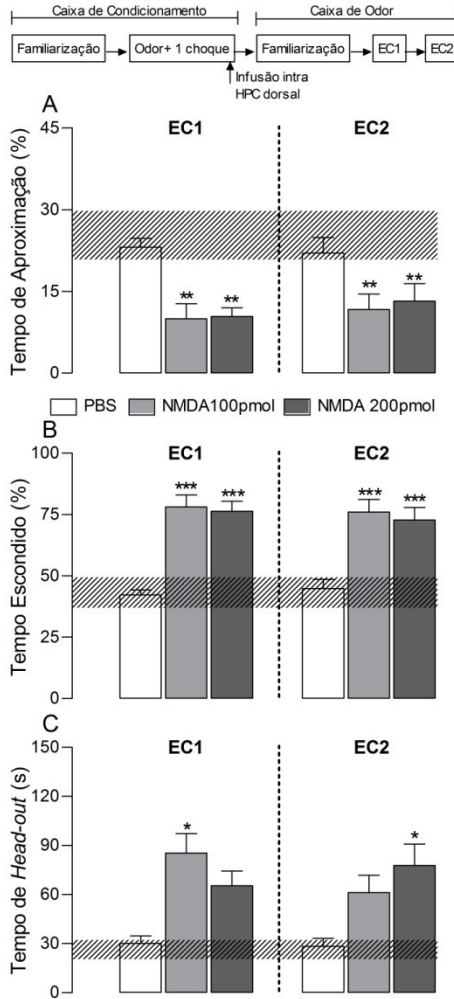


Figura 12. Efeito da infusão de NMDA no hipocampo dorsal na potencialização do condicionamento olfatório aversivo. Os animais foram submetidos a um treino fraco (odor+1choque) e, imediatamente após, receberam PBS, NMDA 100 ou NMDA 200 pmol no HPCd. As colunas representam a média + e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head-out* (C) durante as sessões de teste EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,005$ ; \*\*\* $p < 0,0005$  comparado ao grupo PBS. ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls ( $n=6-8$ ).

#### **4.8 *Experimento 8: Efeito da estimulação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo ventral no condicionamento olfatório aversivo***

##### **4.8.1 *Experimento 8.1: Efeito da infusão de NMDA no hipocampo ventral na formação do condicionamento olfatório aversivo***

No experimento 8.1, durante o segundo dia do protocolo experimental, os animais receberam PBS ou NMDA nas doses de 100 ou 200 pmol no hipocampo ventral e foram imediatamente colocados na caixa de condicionamento na presença do odor de acetato de amila durante 10 minutos.

Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos PBS ou NMDA (100 ou 200 pmol) na etapa de familiarização na caixa de odor.

Nas etapas de teste EC1 e EC2, a ANOVA para os parâmetros % de tempo de aproximação, % de tempo escondido e tempo de *head-out* não detectou diferenças significativas no fator tratamento [ $F(2,21)=1,449$ ,  $p=0,257$ ;  $F(2,21)=3,116$ ,  $p=0,065$ ;  $F(2,21)=0,482$ ,  $p=0,624$ ], no fator repetição [ $F(1,21)=0,134$ ,  $p=0,718$ ;  $F(1,21)=0,224$ ,  $p=0,641$ ;  $F(1,21)=0,564$ ,  $p=0,461$ ] e na interação entre o tratamento e a repetição [ $F(2,21)=2,054$ ,  $p=0,153$ ;  $F(2,21)=0,618$ ,  $p=0,549$ ;  $F(2,21)=1,287$ ,  $p=0,297$ ] entre os ratos que receberam PBS, NMDA 100 ou 200 pmol no hipocampo ventral (figura 13).

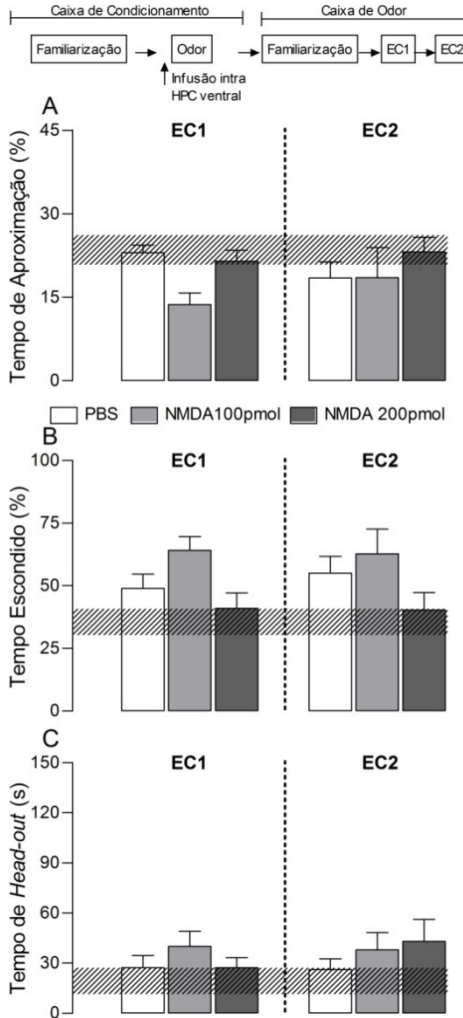


Figura 13. Efeito da infusão de NMDA no hipocampo ventral na formação do condicionamento olfatório aversivo. Os animais receberam PBS, NMDA 100 ou NMDA 200 pmol no HPCv e foram imediatamente colocados na caixa de condicionamento na presença do odor de acetato de amila. As colunas representam a média + e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head-out* (C) durante as sessões de teste EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. ANOVA de medidas repetidas (n=6-8).

#### 4.8.2 Experimento 8.2: Efeito da infusão de NMDA no hipocampo ventral na potencialização do condicionamento olfatório aversivo

No experimento 8.2, na sessão de condicionamento, os animais foram submetidos a um protocolo de treino fraco, onde somente um choque elétrico nas patas (0,4mA/2s) foi aplicado na presença do odor de acetato de amila. Imediatamente após esta sessão, os animais receberam PBS ou NMDA (100 ou 200 pmol) no hipocampo ventral. Na etapa de familiarização na caixa de odor, não foram detectadas diferenças significativas entre os ratos que receberam PBS ou NMDA (100 ou 200 pmol), imediatamente após a sessão de treino fraco.

Nas sessões de teste EC1 e teste EC2, a ANOVA detectou diferenças significativas no fator repetição para o parâmetro % de tempo de aproximação [ $F(1,19) = 18,54$ ,  $p < 0,001$ ], mas não no fator tratamento [ $F(2,19) = 3,22$ ,  $p = 0,062$ ] e na interação entre o tratamento e a repetição [ $F(2,19) = 0,52$ ,  $p = 0,605$ ]. Ainda, foram detectadas diferenças significativas através da ANOVA no fator repetição e interação entre os fatores tratamento e repetição para o parâmetro % de tempo escondido [ $F(1,19) = 28,07$ ,  $p < 0,001$ ;  $F(2,19) = 3,60$ ,  $p = 0,047$ ], mas não no fator tratamento [ $F(2,19) = 2,52$ ,  $p = 0,107$ ]. Não foram detectadas diferenças significativas no fator tratamento [ $F(2,19) = 3,394$ ,  $p = 0,055$ ], no fator repetição [ $F(1,19) = 3,242$ ,  $p = 0,088$ ] e na interação entre o tratamento e a repetição [ $F(2,19) = 0,504$ ,  $p = 0,612$ ] para o parâmetro tempo de *head-out*. Comparações *post hoc* revelaram um aumento significativo na % de tempo escondido nos grupos NMDA 100 e 200 pmol na sessão de teste EC2 em relação aos mesmos grupos na sessão de teste EC1.

Embora tenha sido detectada uma diferença estatística nos valores de tempo de aproximação entre as sessões de teste EC1 e EC2, não foram reveladas diferenças relacionadas ao tratamento utilizado no hipocampo ventral após a sessão de treino fraco. Assim, tanto o grupo controle PBS quanto os grupos tratados com NMDA (100 nmol ou 200 pmol) exibiram uma redução da % de tempo de aproximação durante a sessão de teste EC2 quando comparado ao teste EC1. Ainda, a diferença estatística encontrada entre as sessões de teste EC1 e EC2 para o tempo escondido não revelou diferenças estatísticas entre os grupos tratados com NMDA e o controle. Desta forma, apesar de detectadas diferenças estatísticas entre os grupos e as sessões, estas não foram relevantes para determinar o efeito da estimulação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo ventral na potencialização do condicionamento olfatório aversivo, conforme figura 14.

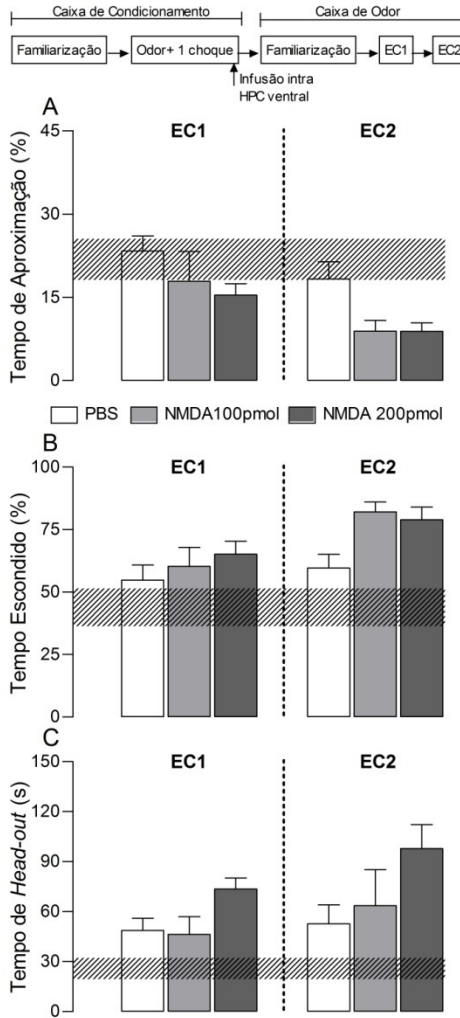


Figura 14. Efeito da infusão de NMDA no hipocampo ventral na potencialização do condicionamento olfatório aversivo. Os animais foram submetidos a um treino fraco (odor+1choque) e, imediatamente após, receberam PBS, NMDA 100 ou NMDA 200 pmol no HPCv. As colunas representam a média + e.p.m. do tempo de aproximação (A), do tempo escondido (B) e do tempo de *head-out* (C) durante as sessões de teste EC1 e EC2. As barras horizontais representam o intervalo de confiança (95%) superior e inferior da média dos dados obtidos durante a sessão de familiarização. ANOVA de medidas repetidas seguida do teste *post hoc* Newman-Keuls ( $n=6-9$ ).



## 5. Discussão

Os resultados obtidos no presente trabalho confirmaram a hipótese formulada demonstrando o papel funcional distinto dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo dorsal e ventral na formação e expressão do condicionamento olfatório aversivo e do condicionamento contextual de segunda ordem.

As etapas que compõem a formação do condicionamento olfatório aversivo são a aquisição e a consolidação da memória aversiva. Durante a formação deste condicionamento ocorre a convergência das informações relacionadas ao odor (EC1) e ao choque elétrico nas patas (EI). Na consolidação ocorre o armazenamento da memória olfatória aversiva recém adquirida, sendo este evento dependente de síntese proteica. Como não houve qualquer manipulação farmacológica após a sessão de condicionamento, o bloqueio farmacológico promovido pelo AP5 sobre os receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no hipocampo dorsal ou ventral determinaria a participação destas estruturas na formação (aquisição+consolidação) do condicionamento olfatório aversivo. Assim, os dados obtidos no presente estudo sugerem que a formação da memória olfatória aversiva foi prejudicada pelo bloqueio dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA aplicado apenas na região dorsal do hipocampo. Durante o teste EC1, sessão onde o estímulo condicionado foi apresentado, os animais tratados com AP5 antes da sessão de condicionamento exibiram uma redução da resposta emocional condicionada, representada pelo aumento na porcentagem de tempo próximo à fonte de odor e pela redução da porcentagem de tempo escondido no compartimento fechado quando comparados ao grupo controle (PBS). Da mesma forma, o conjunto de respostas defensivas promovido frente ao contexto da exposição ao odor, teste EC2, foi significativamente reduzido.

Embora alguns trabalhos tenham apontado para a participação da porção ventral do hipocampo na formação do condicionamento aversivo (BAST; ZHANG; FELDON, 2001; CZERNIAWSKI; YOON; OTTO, 2009; CZERNIAWSKI et al., 2011; CZERNIAWSKI et al., 2012; MAREN, 1999; RICHMOND et al., 1999; YOON; OTTO, 2007; ZHANG; BAST; FELDON, 2001), no presente estudo, a injeção de AP5 no hipocampo ventral, antes do pareamento entre o odor e os choques nas patas, não interferiu na formação do condicionamento olfatório aversivo. Esta disparidade de resultados parece estar relacionada ao uso de protocolos distintos durante a sessão de condicionamento.

O condicionamento adotado neste trabalho foi estabelecido pela emissão dos choques elétricos (EI) na presença constante do odor de acetato de amila (EC1) durante toda a sessão, não caracterizando este protocolo como condicionamento de atraso ou de traço. A sessão de condicionamento foi realizada na caixa de condicionamento, ao passo que as sessões subsequentes, onde foi avaliada a resposta emocional condicionada, ocorreu na caixa de odor. Embora o contexto de condicionamento (caixa de condicionamento) não tenha sido utilizado durante a avaliação da resposta emocional condicionada, a apresentação apenas ao odor (EC1) em outro contexto (caixa de odor) foi suficiente para gerar um repertório de comportamentos defensivos (KROON; CAROBREZ, 2009). Desta forma, devido à relevância biológica do sentido do olfato para os roedores (RESTREPO et al., 2004), os resultados apresentados sugerem que a informação olfatória, saliente no contexto de condicionamento, é interpretada como um componente do contexto de condicionamento e passa a integrar a associação com o evento aversivo. Ainda, estes dados sugerem que a porção dorsal do hipocampo é fundamental na interpretação desta informação. Estes resultados corroboram estudos prévios que demonstram o importante papel do hipocampo dorsal na formação de uma representação unificada dos elementos avulsos que compõem um contexto (YOUNG; BOHENEK; FANSELOW, 1994) e que esta ativação parece depender de receptores glutamatérgicos subtipo NMDA (BAST; ZANG; FELDON, 2003).

O papel do hipocampo dorsal na integração das informações e formação da representação unificada do contexto é justificado principalmente pela densa rede de conexões que esta região exibe com importantes áreas encefálicas envolvidas na codificação, organização e representação da navegação espacial (CENQUIZCA; SWANSON, 2007; ISHIZUKA, 2001; JEFFERY, 2007; KISHI et al., 2000; POTHUIZEN; AGGLETON; VANN, 2008; SWANSON; COWAN, 1975; TAUBE, 2007; VAN GROEN; WYSS, 2003; VOGT; MILLER, 1983). Além disso, a região CA1 da porção dorsal do hipocampo exibe uma grande densidade de “células de lugar” (do inglês, *place cells*) (JUNG; WIENER; MCNAUGHTON, 1994), neurônios responsáveis pela localização espacial (O’KEEFE; DOSTROVSKY, 1971; O’KEEFE; NADEL, 1978). Aliada a essas evidências anatômicas, a alta densidade de receptores glutamatérgicos subtipo NMDA nesta região (RIEDEL; PLATT; MICHEAU, 2003) favorece a formação da representação espacial (STEELE; MORRIS, 1999; LEE; KESNER, 2002).

Estudos utilizando protocolos de condicionamento contextual aversivo observaram que lesões no hipocampo dorsal de ratos prejudicaram a formação da memória aversiva ao contexto (SELDEN et al., 1991; PHILIPS; LEDOUX, 1992). Estes testes foram conduzidos de forma que o contexto servia de “estímulo de fundo” para um condicionamento auditivo aversivo. Phillips e LeDoux (1994) observaram que a participação do hipocampo dorsal no condicionamento contextual aversivo estava realmente vinculada à utilização do contexto como “estímulo de fundo”, pois a formação da associação entre apenas o contexto (EC) e o choque elétrico nas patas (EI) não foi prejudicada pela lesão da porção dorsal hipocampal. Ainda, num trabalho realizado por Otto e Poon (2006) foi observado que lesões excitotóxicas no hipocampo dorsal prejudicaram a formação da memória contextual aversiva, onde um odor foi utilizado como elemento constituinte do contexto e sinalizador da ameaça representada pela associação entre o contexto e o choque elétrico. Contudo, a formação da memória aversiva gerada pelo pareamento entre a apresentação de um estímulo olfatório que co-terminava com a emissão de um choque elétrico nas patas não foi prejudicada pela lesão excitotóxica na região dorsal do hipocampo.

Os resultados apresentados, aliados aos dados obtidos em estudos usando protocolos de condicionamento contextual aversivo e condicionamento de traço (BAST, ZHANG, FELDON, 2003; QUINN et al., 2005; CZERNIAWSKI et al., 2012), sugerem que o hipocampo dorsal é responsável pela integração dos diferentes elementos que compõem o ambiente de condicionamento e pela formação de uma representação espacial e multimodal deste contexto. Ao passo que, a ausência de efeito do antagonista glutamatérgico subtipo NMDA no hipocampo ventral sobre a formação da memória olfatória aversiva observada no presente estudo sugere que a contribuição desta porção do hipocampo é complementar à função do hipocampo dorsal em formar uma representação contextual (BAST; ZHANG; FELDON, 2001; ZHANG; BAST; FELDON, 2001).

A expressão de uma memória aversiva necessariamente envolve a evocação, assim como a tradução da associação numa resposta aversiva apropriada (GARAKANI; MATHEW; CHARNEY, 2006). Foi estabelecido, neste trabalho, que a evocação do condicionamento aversivo seria representada pela expressão da resposta emocional condicionada decorrente da apresentação ao odor condicionado (EC1) e ao contexto condicionado (EC2). Assim, foi determinado que o prejuízo na expressão da resposta emocional condicionada, promovido pela

injeção do antagonista dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA antes da sessão de teste EC1 ou da sessão de teste EC2, representaria o prejuízo na expressão do condicionamento olfatório aversivo ou do condicionamento de segunda ordem, respectivamente.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram que o bloqueio dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA, antes da sessão de teste EC1, tanto na porção dorsal quanto na porção ventral, foi capaz de prejudicar a expressão dos comportamentos defensivos frente ao odor condicionado (EC1).

A infusão de AP5 no hipocampo dorsal, em ambas as doses, promoveu um aumento no tempo em que estes animais permaneceram próximos da fonte de odor, uma redução no tempo em que permaneceram no compartimento fechado e uma diminuição no tempo em que exibiram comportamento de avaliação de risco. Neste sentido, foi sugerido que a representação contextual adquirida durante a fase de aquisição passou a ser evocada no momento em que o estímulo olfatório condicionado foi reapresentado durante o teste EC1. Devido à importância adaptativa do sentido do olfato para os roedores (LLEDO; GHEUSI; VINCENT, 2005), a reexposição apenas ao estímulo olfatório foi suficiente para promover a recuperação da informação, através da ativação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA da porção dorsal do hipocampo, acerca da representação aversiva adquirida pelo contexto durante o condicionamento. Estes dados estão de acordo com resultados prévios que demonstraram a importância do hipocampo dorsal na expressão do condicionamento contextual aversivo e condicionamento de traço (HUNSAKER et al., 2008; LEE; KESNER, 2004; MAREN; HOLT, 2000; QUINN et al., 2005). Ainda, em concordância com os achados deste estudo estão os resultados de Melik e colaboradores (2006) que demonstraram que a infusão de AP5 no hipocampo dorsal de ratos prejudicou a expressão do condicionamento contextual aversivo quando os animais foram reexpostos a uma pequena fração do contexto de condicionamento. Contudo, a resposta condicionada não foi prejudicada quando os animais foram reexpostos ao contexto de condicionamento propriamente dito. Os autores sugeriram que os receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo dorsal seriam cruciais na expressão de memórias associativas na presença de pistas sensoriais insuficientes. Desta forma, a apresentação a apenas um elemento sensorial relacionado ao contexto de condicionamento, ou seja, ao odor condicionado (EC) durante o teste EC1, parece recrutar os receptores glutamatérgicos NMDA no hipocampo dorsal para promover a expressão do condicionamento

olfatório aversivo. Portanto, a construção da associação odor+choque parece ter acontecido utilizando o contexto como “estímulo de fundo” (MAREN; HOLT, 2000) e a apresentação a uma pista sensorial (odor) foi capaz de atualizar toda a representação contextual e promover a recuperação da memória aversiva.

Assim como no hipocampo dorsal, a infusão de AP5 antes da sessão de teste EC1 no hipocampo ventral promoveu uma redução no repertório de respostas defensivas frente ao odor condicionado. Estes resultados estão de acordo com outros trabalhos que observaram a participação do hipocampo ventral na expressão do condicionamento contextual aversivo, condicionamento aversivo de atraso e de traço (HUNSAKER et al., 2008; CZERNIWASKI et al., 2009; CZERNIAWSKI et al., 2012). A participação do hipocampo ventral no condicionamento aversivo parece estar vinculada principalmente as conexões existentes com estruturas encefálicas, tais como amígdala e hipotálamo, estruturas já estabelecidas na circuitaria do condicionamento aversivo, bem como na organização de respostas de defesa (CANTERAS; SWANSON, 1992; CENQUIZCA; SWANSON, 2007; PETROVICH; CANTERAS; SWANSON, 2001; PITKANEN et al., 2000; RISOLD; SWANSON, 1996). Assim, alguns trabalhos sugerem que a participação do hipocampo ventral na expressão do condicionamento aversivo seja decorrente de sua íntima ligação com a amígdala (PITKANEN et al., 2000; SWANSON; COWAN, 1977), uma vez que a plasticidade sináptica no núcleo basolateral parece ser regulada pelo hipocampo ventral (MAREN; FANSELOW, 1995). Desta forma, a interação entre o hipocampo ventral e a amígdala parece contribuir na mediação de vários aspectos relacionados ao aprendizado associativo, entre eles a expressão do condicionamento aversivo (CZERNIAWSKI et al., 2012). Além disso, a forte conectividade com a amígdala e o hipotálamo enfatiza a importância desta porção hipocampal na emocionalidade e expressão de comportamentos defensivos (BANNERMAN et al., 2004). O bloqueio dos receptores glutamatérgicos NMDA do hipocampo ventral conduzido no presente trabalho pode ter promovido uma interrupção da seleção de respostas adequadas durante a expressão da resposta aversiva. O papel do hipocampo na escolha de respostas apropriadas frente a situações ameaçadoras foi sugerido por Gray e McNaughton (2000). O Sistema de Inibição Comportamental (SIC) foi proposto por estes autores como a circuitaria neural envolvida na modulação da ansiedade, exibindo como substrato neural a formação septo-hipocampal. Estudos baseados no comportamento defensivo incondicionado demonstraram que a

inativação temporária ou o antagonismo glutamatérgico da porção ventral do hipocampo prejudicou a expressão da resposta de defesa no labirinto em cruz elevado (BERTOGLIO; JOCA; GUIMARÃES, 2006; NASCIMENTO HACKL; CAROBREZ, 2007) e frente ao odor de predador (HACKL, 2007). Portanto, o bloqueio dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no hipocampo ventral parece ter interferido nos aspectos emocionais do comportamento defensivo, reduzindo o conflito entre a expressão das respostas de defesa e a ameaça representada pelo estímulo olfatório condicionado.

Semelhante ao demonstrado no teste EC1, foi observado que a resposta de defesa permaneceu reduzida no teste EC2 quando o antagonismo dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA foi realizado tanto no hipocampo dorsal quanto no ventral antes da sessão de teste EC1. A falha no reconhecimento do estímulo olfatório como elemento constituinte do contexto aversivo, através do bloqueio dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA, parece ter promovido um prejuízo na formação do condicionamento contextual de segunda ordem. A associação entre o contexto (EC2) e o estímulo olfatório (EC1) não ocorreu, provavelmente porque o EC1 não foi caracterizado como um estímulo suficientemente aversivo para gerar um novo pareamento.

O condicionamento de segunda ordem é um processo de aprendizagem onde o EC2 adquire relevância associativa após ser pareado com o EC1, e não com um EI. A fase de aquisição é caracterizada pelo pareamento EC1-EC2 e é dependente do pareamento prévio entre EC1 e EI. Portanto, a expressão do condicionamento de segunda ordem é avaliada através da reexposição somente ao EC2 (GEWIRTZ; DAVIS, 2000). A elucidação dos mecanismos envolvidos no processamento do condicionamento de segunda ordem é fundamental, uma vez que sua abordagem é mais próxima de situações reais, visto que a construção do aprendizado é geralmente integrada por memórias de experiências prévias (DEBIEC et al., 2006). Estudos abordando o condicionamento de segunda ordem geralmente intervêm na fase de formação do novo aprendizado. Através de estudos de condicionamento de segunda ordem tanto apetitivos quanto aversivos, foi demonstrado que a amígdala basolateral é uma estrutura importante na aquisição da nova associação (EC1-EC2) (GEWIRTZ; DAVIS, 1997; HATFIELD et al., 1996; PARKES; WESTBROOK, 2010; SETLOW; GALLAGHER; HOLLAND, 2002). Um trabalho realizado por Tronel e colaboradores (2005), utilizando um protocolo experimental parecido ao conduzido neste trabalho, levantou a hipótese de que a sessão de teste EC1 poderia mediar dois processos diferentes e independentes: a

formação de uma nova associação (EC1-EC2) ou a reconsolidação da informação já adquirida (EC1-EI). Os resultados obtidos por Tronel e colaboradores demonstraram a participação prevalente do hipocampo na consolidação da nova associação (EC1-EC2) e da amígdala na reconsolidação da associação EC1-EI. Com base nos resultados de Tronel, foi observado neste trabalho que o antagonismo dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA realizado antes da sessão de teste EC1 tanto no hipocampo dorsal quanto no ventral prejudicou tanto a expressão do condicionamento olfatório aversivo quanto a aquisição de uma nova associação (EC1-EC2).

Em função da relevância do condicionamento de segunda ordem no entendimento de processos de aprendizagem associativa, foi avaliado o efeito do antagonismo dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA na porção dorsal ou ventral do hipocampo na expressão da resposta emocional condicionada relacionada à associação EC1-EC2. A administração de AP5 tanto no hipocampo dorsal quanto no ventral não prejudicou a expressão das respostas defensivas frente ao contexto condicionado (EC2). Apesar da importância do hipocampo na expressão de memórias aversivas (ALVARES et al., 2012; CORCORAN; MAREN, 2001), conforme demonstrado no presente trabalho para o condicionamento olfatório de primeira ordem (EC1-EI), a expressão da associação EC1-EC2 parece recrutar outras áreas encefálicas. Além do hipocampo, estruturas como a amígdala, o córtex entorrinal, o parietal e o cíngulo parecem participar da fase de expressão da memória aversiva (IZQUIERDO et al., 1997; 2004). Desta forma, utilizando o protocolo experimental apresentado neste trabalho e o sistema de neurotransmissão glutamatérgica subtipo NMDA como ferramenta farmacológica, os dados obtidos neste estudo sugerem que o condicionamento contextual de segunda ordem depende das porções hipocámpais para a codificação da associação entre o estímulo olfatório condicionado (EC1) e o contexto (EC2), mas não para a expressão desta nova associação.

Os resultados obtidos através do uso de antagonista dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no hipocampo revelaram o papel do hipocampo dorsal na formação do condicionamento olfatório aversivo e de ambas as porções dorsal e ventral na expressão do condicionamento olfatório aversivo e na formação do condicionamento contextual de segunda ordem. Embora o antagonismo dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA seja uma ferramenta útil em determinar o recrutamento de estruturas encefálicas na circuitaria das memórias aversivas, a utilização do agonista destes receptores durante a fase de

condicionamento pode também revelar a participação de regiões encefálicas na formação da memória aversiva através da estimulação da transmissão mediada pelos receptores NMDA.

Estudos prévios realizados neste laboratório demonstraram que a estimulação química da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral (KINCHESKI, 2011) ou do núcleo pré-mamilar dorsal do hipotálamo (PAVESI; CANTERAS; CAROBREZ, 2011), agindo como estímulo incondicionado, foi capaz de promover o condicionamento olfatório aversivo em ratos. Estas estruturas, assim como o hipocampo, estão envolvidas na emissão das respostas defensivas frente ao predador ou ao odor de predador (AGUIAR; GUIMARÃES, 2009; BLANCHARD et al., 2005; CANTERAS et al., 2008; DIELENBERG; LEMAN; CARRIVE, 2004; PENTKOWSKI et al., 2006). Portanto, a neurobiologia do condicionamento olfatório aversivo parece compartilhar de estruturas encefálicas que integram o circuito ativado durante a exposição ao predador ou a pistas relacionadas a ele.

Com base na circuitaria envolvida no condicionamento olfatório aversivo proposta por Canteras e colaboradores (2008) e nos dados anteriores que apontam a participação do hipocampo na circuitaria deste condicionamento, foi realizada a estimulação da região dorsal ou ventral do hipocampo. Esta etapa teve como objetivo avaliar se a ativação do hipocampo poderia atuar como estímulo incondicionado capaz de promover o condicionamento.

Ursin e colaboradores (1966) estudaram a auto-estimulação elétrica da formação hipocampal em ratos e observaram, após a estimulação elétrica do giro hipocampal ou do giro denteado, um aumento ou uma redução do comportamento operante, respectivamente. Apesar deste resultado, os autores relataram que a resposta gerada pela estimulação desta região foi significativamente menor e menos robusta se comparada àquela observada após a estimulação de estruturas hipotalâmicas. Ainda, Kaada e colaboradores (1971) observaram que a estimulação elétrica das porções dorsal e ventral do hipocampo não alterou respostas autonômicas como respiração ou ritmo cardíaco em coelhos submetidos ao teste de condicionamento aversivo. Contudo, um trabalho conduzido por Dzidzishvili e Davituliani em 1978 demonstrou que a estimulação elétrica das porções dorsal e ventral do hipocampo em gatos foi capaz de agir como estímulo incondicionado e promover o condicionamento aversivo quando pareada com um estímulo sonoro (EC). Neste mesmo estudo, a estimulação hipocampal ocasionou respostas comportamentais muito semelhantes àsquelas observadas em situações de medo natural. Em geral, uma conduta inicial de fuga



acompanhada de respostas vegetativas como midríase, defecação e micção. Adicionalmente, os autores relatam que mesmo na ausência de fuga, os gatos miavam permanentemente e, apesar de famintos, recusavam-se a comer.

Embora os dados acima apontem para uma possível ação do hipocampo como estímulo incondicionado, o pareamento entre odor de acetato de amila e a microinjeção bilateral de NMDA, tanto na porção dorsal quanto na ventral, não resultou em respostas defensivas quando o estímulo olfatório foi reapresentado. Da mesma forma, o condicionamento de segunda ordem não foi observado, pois não foram evidenciados comportamentos defensivos frente ao contexto onde o odor foi reexposto. Logo, a estimulação da porção dorsal ou da porção ventral do hipocampo não foi capaz de atuar como estímulo incondicionado para converter o estímulo olfatório neutro em condicionado. Uma possível justificativa para a divergência entre os resultados obtidos no presente trabalho e os dados demonstrados por Dzidzishvili e Davituliani seria primariamente a natureza do estímulo aplicado. No trabalho realizado por Dzidzishvili e Davituliani foi aplicada a estimulação elétrica como estímulo incondicionado. A estimulação elétrica pode ter promovido a ativação, de maneira retrógrada, de estruturas que estão projetando para o hipocampo. Além disso, este tipo de estimulação pode também ter afetado fibras de passagem, podendo envolver também a estimulação de estruturas que projetam através do hipocampo. No presente trabalho, por outro lado, foi utilizada a estimulação química de apenas um subtipo de receptor glutamatérgico como estímulo incondicionado.

Apesar da ausência de efeito da microinjeção de NMDA no hipocampo agindo como estímulo incondicionado, a estimulação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA do hipocampo dorsal logo após um protocolo de treino fraco, onde apenas um choque elétrico nas patas foi pareado ao odor de acetato de amila, foi capaz de facilitar a consolidação do traço de memória. Esta potencialização resultou em respostas defensivas robustas, muito semelhantes àquelas onde o condicionamento foi obtido através do pareamento entre cinco choques e o odor de acetato de amila. Adicionalmente, o caráter aversivo adquirido pelo estímulo olfatório (EC) após o pareamento e a estimulação foi suficiente para promover uma nova associação com o contexto (EC2), caracterizando o estabelecimento do condicionamento contextual de segunda ordem. Em contrapartida, a estimulação da região ventral do hipocampo, imediatamente após o pareamento com um único

choque, não promoveu a potencialização do condicionamento olfatório aversivo, sugerindo o papel específico da região dorsal neste evento.

Estudos realizados por Bast e colaboradores (2003) e Zhang e colaboradores (2001) observaram que a estimulação das regiões dorsal e ventral, respectivamente, através da microinjeção bilateral de NMDA, prejudicou o estabelecimento tanto do condicionamento contextual quanto do condicionamento auditivo aversivo de atraso. Os autores atribuíram este prejuízo à ativação exacerbada tanto do hipocampo quanto de suas eferências, promovida pela ação do NMDA, o que pode ter interferido com a sinalização apropriada da associação contexto+choque e do pareamento som+choque. Contudo, a estimulação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA foi realizada antes da sessão de pareamento e os treinos aplicados durante estes experimentos foram considerados efetivos em promover o condicionamento aversivo, situação esta diferente da conduzida no presente estudo. Neste trabalho, a ativação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA, ao contrário do observado nos trabalhos anteriormente mencionados, parece ter interferido no sentido de potencializar a consolidação do traço de memória decorrente da “fraca” associação EC1-EI.

Frey e Morris (1997) demonstraram em seus experimentos de marcação sináptica (do inglês, *synaptic tagging*) que a aplicação de estímulos subefetivos em preparações do hipocampo, um análogo *in vitro* para o treino fraco utilizado neste trabalho, gera um tipo de LTP transitória que pode se tornar persistente e de longo prazo caso um novo estímulo relevante seja aplicado dentro de um período crítico próximo da indução da forma transitória de LTP. Ballarini e colaboradores (2009), em estudos de marcação comportamental (do inglês, *behavioral tagging*), relataram que a LTP hipocampal pode ser reforçada através da exposição a um ambiente novo. Eles demonstraram que animais submetidos a um treino fraco no condicionamento contextual aversivo não apresentavam respostas defensivas no teste realizado vinte e quatro horas depois. Contudo, se uma exposição ao campo aberto fosse incorporada ao protocolo, as respostas defensivas passariam a ser eliciadas no teste. Portanto, o traço de memória associado ao treino fraco poderia ser efetivamente consolidado como uma memória de longo prazo quando uma apresentação a um novo ambiente aversivo fosse adicionada ao protocolo. Ainda, este processo parece ser dependente de síntese proteica, uma vez que a microinjeção de anisomicina (inibidor de síntese proteica) no hipocampo dorsal prejudicou a consolidação desta memória aversiva.

Portanto, os dados do presente estudo sugerem que a estimulação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA na região dorsal do hipocampo, em ratos submetidos ao condicionamento olfatório aversivo, parece ter reforçado a LTP transitória induzida pelo pareamento entre o odor de acetato de amila e um único choque nas patas (treino fraco), promovendo a conversão em uma LTP persistente e a consolidação da memória olfatória aversiva. Adicionalmente, a especificidade da região dorsal em promover este evento parece estar vinculada a maior densidade de receptores NMDA e AMPA nesta região, além da maior expressão de NR2A, subunidade intimamente relacionada à indução de LTP hipocampal (PANDIS et al., 2006).

Os dados obtidos no presente estudo, através da utilização de antagonista e agonista dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA, demonstraram a participação destes receptores no hipocampo dorsal tanto na formação quanto na expressão do condicionamento olfatório aversivo. Estes resultados estão de acordo com estudos já publicados (IZQUIERDO et al., 1992; ROESLER et al., 2006) e dados previamente obtidos neste laboratório utilizando o teste de esQUIVA inibitória onde a injeção de AP5 no hipocampo dorsal antes do treino prejudicou a formação da memória contextual aversiva (HACKL, 2007). Com base no trabalho de HACKL (2007) e nas evidências que demonstram a participação do hipocampo dorsal na formação de uma representação unificada dos elementos avulsos que compõem um contexto (YOUNG; BOHENEK; FANSELOW, 1994), os resultados do presente trabalho sugerem que a formação da memória olfatória aversiva está vinculada à interpretação da informação olfatória, realizada pelo hipocampo dorsal, como componente do contexto de condicionamento e, consequentemente, elemento integrante do evento aversivo. Desta forma, o hipocampo dorsal parece participar da construção de memórias aversivas quando estas associações envolvem informações novas, difusas e multimodais. A expressão destas memórias aversivas também parece depender da participação do hipocampo dorsal na interpretação de informações incompletas acerca da associação aversiva. O protocolo de condicionamento olfatório aversivo adotado no presente trabalho demonstrou que a exposição a apenas um elemento que compõe o contexto de condicionamento, o odor condicionado, é capaz de eliciar um conjunto de repostas defensivas. Foi observado que o antagonismo dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no hipocampo dorsal promoveu um prejuízo na expressão destas repostas defensivas relacionadas ao odor condicionado. Assim, de acordo com Melik e colaboradores, os dados do presente trabalho sugerem o papel crucial

dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no hipocampo dorsal na expressão de memórias associativas na presença de pistas insuficientes.

Os resultados obtidos no presente estudo demonstraram ainda a participação dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no hipocampo ventral apenas na expressão do condicionamento olfatório aversivo. Estes dados estão de acordo com resultados anteriormente obtidos neste laboratório utilizando o teste de odor de gato (HACKL, 2007). Hackl observou que a administração de AP5 prejudicou a expressão das respostas defensivas de ratos expostos ao odor do predador. Com base nestes resultados e em evidências que demonstram a participação da porção ventral do hipocampo na circuitaria encefálica ativada pela exposição ao predador ou a pistas relacionadas a ele (HACKL, 2007; PENTKOWSKI et al., 2006), os dados do presente trabalho sugerem que o hipocampo ventral é fundamental na interpretação emocional aversiva dos estímulos olfatórios, sejam eles aprendidos ou inatos e, consequentemente, interfere na expressão das respostas defensivas relacionadas ao odor. Diferentemente do hipocampo dorsal, o hipocampo ventral parece ser recrutado em situações onde o estímulo olfatório é a fonte aversiva, independente do vínculo com outros elementos, como o contexto. Desta forma, os dados apresentados neste trabalho sugerem que na presença de pistas insuficientes relacionadas ao contexto de condicionamento, o hipocampo dorsal é fundamental na expressão do condicionamento aversivo, ao passo que na presença de uma pista condicionada, não vinculada a um contexto aversivo, mas a um evento aversivo e, portanto, uma pista completa, o hipocampo ventral é recrutado na expressão da resposta emocional aversiva.

Com base na circuitaria do condicionamento olfatório aversivo proposto por Canteras e colaboradores (2008; 2012) e nos resultados obtidos no presente estudo, foi elaborada uma possível rota neuroanatômica que seria ativada durante a formação ou a expressão do condicionamento olfatório aversivo. Assim, como proposto na figura 15, durante a formação da memória olfatória aversiva, o estímulo incondicionado (choque elétrico nas patas) promove a ativação da porção ventrolateral da MCP e através de suas projeções via tálamo e áreas corticais a informação aversiva é enviada a áreas associativas tais como o hipocampo e a amígdala. A porção dorsal do hipocampo em associação a regiões corticais, tais como o córtex cingulado, o córtex retrosplenial e o córtex pós-rinal parecem estar envolvidas na aquisição de informações contextuais e os núcleos mediais da amígdala envolvidos na aquisição de informações olfatórias. Assim, o hipocampo

bem como os núcleos amígdalares parecem ser sítios fundamentais na codificação do condicionamento olfatório aversivo.

Durante a expressão da memória olfatória aversiva, conforme ilustrado na figura 16, parece ocorrer o recrutamento das porções dorsal e ventral do hipocampo, assim como dos núcleos amígdalares. Através do septo lateral e da amígdala basomedial posterior, o hipocampo e a amígdala, respectivamente, projetam-se para o SDHM. A informação aversiva, através do PMd, alcança a coluna dorsolateral da MCP, promovendo um conjunto de respostas defensivas frente ao odor condicionado. Esta resposta emocional condicionada decorrente da apresentação ao EC1 na caixa de odor (EC2) promove uma nova associação EC1-EC2. A formação do condicionamento contextual de segunda ordem parece seguir uma rota semelhante à via neuroanatômica sugerida na formação do condicionamento olfatório aversivo (figura 15), contudo, com base nos resultados comportamentais aqui apresentados, a participação de ambas as porções dorsal e ventral do hipocampo parecem ser fundamentais na formação da associação EC1-EC2, conforme figura 16.

Os resultados obtidos no presente trabalho evidenciam o papel do hipocampo nas diferentes etapas que compõem o condicionamento olfatório aversivo enfatizando a validade deste teste como ferramenta no estudo da formação e expressão de memórias olfatórias emocionais. Conforme mencionado anteriormente, as memórias olfatórias estão intimamente relacionadas a eventos emocionais (HERZ, 1997) e, portanto, podem estar envolvidas no desenvolvimento de transtornos psiquiátricos se associadas a um evento traumático. Como previamente discutido, alguns trabalhos demonstram que odores específicos associados a um trauma podem precipitar memórias emocionais e induzir lembranças traumáticas em pacientes com TEPT (KLINE, RAUSCH, 1985; VERMETTEN et al., 2007). Ainda, estudos demonstram que alterações de volume e ativação hipocampal são importantes marcadores neurais associados ao TEPT (KARL et al., 2006; KITAYAMA et al., 2005; SCHUFF et al., 2001; SMITH, 2005). Desta forma, uma vez que o hipocampo exibe um papel importante na formação e expressão de memórias relacionadas à associação de uma representação contextual de múltiplas pistas a um evento aversivo, alterações nesta estrutura encefálica em pacientes com TEPT parecem promover um prejuízo no desenvolvimento de estratégias de aprendizado associativo (ACHESON; GRESACK; RISBROUGH, 2011). Este prejuízo promove, então, indiscriminadamente diversas associações durante o evento traumático capazes de provocar respostas

de medo numa apresentação subsequente (ACHESON; GRESACK; RISBROUGH, 2012). Desta forma, o entendimento de como as porções do hipocampo exercem suas funções, tanto na formação quanto na expressão de memórias aversivas em animais de experimentação, possibilita o esclarecimento de como alterações relacionadas à atividade desta estrutura podem prejudicar o aprendizado associativo emocional em pacientes com TEPT.

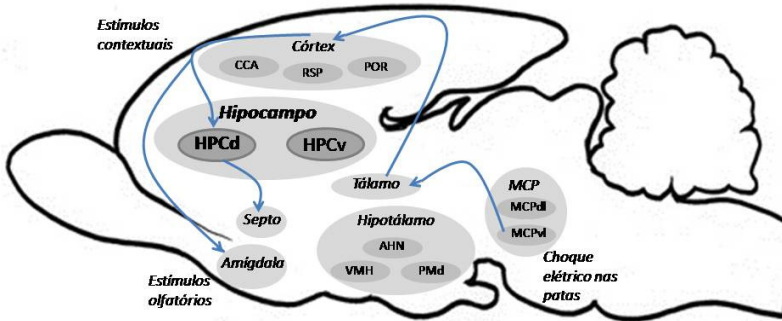


Figura 15. Diagrama esquemático da circuitaria encefálica envolvida na formação do condicionamento olfatório aversivo. A emissão de choques elétricos promove a ativação da MCPvl e através de suas projeções via tálamo e áreas corticais a informação aversiva é enviada a áreas associativas tais como o hipocampo e a amígdala. O HPCd em associação a regiões corticais parecem estar envolvidos na aquisição de informações contextuais e núcleos amigdalares na aquisição de informações olfatórias. Legenda: AHN, núcleo anterior hipotalâmico; CCA, córtex cingulado anterior; HPCd, hipocampo dorsal; HPCv, hipocampo ventral; MCP, matéria cinzenta periaquedutal; MCPdl, matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral; MCPvl, matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral; PMd, núcleo pré-mamilar dorsal hipotalâmico; POR, córtex pós-rinal; RSP, córtex retroesplênico; VMH, núcleo ventromedial hipotalâmico. Adaptado de Gross e Canteras, 2012.

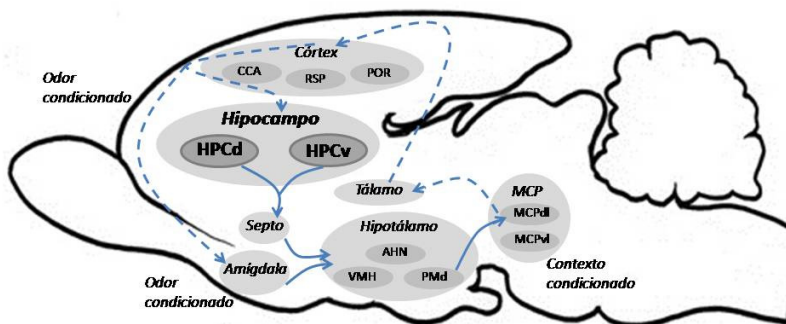


Figura 16. Diagrama esquemático da circuitaria encefálica envolvida na expressão do condicionamento olfatório aversivo e formação do condicionamento contextual de segunda ordem. Durante a exposição ao odor condicionado parece ocorrer o recrutamento das porções dorsal e ventral do HPC, assim como dos núcleos amigdalares. A amígdala e o hipocampo (através do septo) projetam-se para o SDHM. A informação aversiva, através do PMd, alcança a MCPdl, promovendo um conjunto de respostas defensivas frente ao odor condicionado (flechas contínuas). A formação do condicionamento contextual de segunda ordem (flechas pontilhadas) parece ocorrer em decorrência da ativação da MCPdl e expressão das respostas defensivas num contexto inicialmente neutro. Esta informação aversiva é enviada através do tálamo e áreas corticais a áreas associativas tais como o HPCd, HPCv e amígdala, promovendo, então, a formação da associação EC1-EC2. Legenda: AHN, núcleo anterior hipotalâmico; CCA, córtex cingulado anterior; EC1, estímulo condicionado de primeira ordem; EC2, estímulo condicionado de segunda ordem; HPCd, hipocampo dorsal; HPCv, hipocampo ventral; MCP, matéria cinzenta periaquedutal; MCPdl, matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral; MCPvl, matéria cinzenta periaquedutal ventrolateral; PMd, núcleo pré-mamilar dorsal hipotalâmico; POR, córtex pós-rinal; RSP, córtex retroesplênico; VMH, núcleo ventromedial hipotalâmico. Adaptado de Gross e Canteras, 2012.





## 6. Conclusões

Os resultados deste trabalho demonstraram que os receptores glutamatérgicos subtipo NMDA no hipocampo dorsal, mas não no hipocampo ventral, interferiram com a formação do condicionamento olfatório aversivo. A expressão do condicionamento olfatório aversivo, bem como a formação do condicionamento contextual de segunda ordem, foi prejudicada pelo bloqueio dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA tanto no hipocampo dorsal quanto no hipocampo ventral. Contudo, não foi observada a participação dos receptores NMDA do glutamato tanto do hipocampo dorsal quanto do hipocampo ventral na expressão do condicionamento contextual de segunda ordem. Adicionalmente, foi observado que a estimulação destes receptores apenas no hipocampo dorsal, logo após um treino fraco, promoveu a potencialização do condicionamento olfatório aversivo, ao passo que a utilização da injeção de NMDA, tanto no hipocampo dorsal quanto no hipocampo ventral, como estímulo incondicionado, não foi capaz de promover a associação com o estímulo olfatório.

Em conjunto, os dados deste trabalho evidenciam a participação do hipocampo na circuitaria do condicionamento olfatório aversivo e apontam as diferentes funções da porção dorsal e ventral na construção das etapas que constituem este aprendizado aversivo.



## Referências

- ACHESON, D.T.; GRESACK, J.E.; RISBROUGH, V.B. Hippocampal dysfunction effects on context memory: possible etiology for posttraumatic stress disorder. **Neuropharmacology**, 62(2): 674-685, 2012.
- AGUIAR, D.C.; GUIMARAES, F.S. Blockade of NMDA receptors and nitric oxide synthesis in the dorsolateral periaqueductal gray attenuates behavioral and cellular responses of rats exposed to a live predator. **Journal of Neuroscience Research**, 87: 2418-2429, 2009.
- ALVARES, L.O.; EINARSSON, E.O.; SANTANA, F.; CRESTANI, A.P.; HAUBRICH, J.; CASSINI, L.F.; NADER, K.; QUILLFELDT, J.A. Periodically reactivated context memory retains its precision and dependence on the hippocampus. **Hippocampus**, 22: 1092-1095, 2012.
- ANAGNOSTARAS, S.G.; GALE, G.D.; FANSELOW, M.S. Hippocampus and contextual fear conditioning: recent controversies and advances. **Hippocampus**, 11: 8-17, 2001.
- AMARAL, D.G.; WITTER, M.P. The three-dimensional organization of hippocampal formation. **Neuroscience**, 31: 571-591, 1989.
- ANDERSEN, P.; MORRIS, R.; AMARAL, D.; BLISS, T.; O'KEEFE, J. **The hippocampus book**. New York, Oxford University Press, 2007.
- BALLARINI, F.; MONCADA, D.; MARTINEZ, M.C.; ALEN, N.; VIOLA, H. Behavioral tagging is a general mechanism of long-term memory formation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 106: 14599-14604, 2009.
- BANDLER, R. **Brain mechanisms of aggression as revealed by electrical and chemical stimulation: suggestion of a central role for the midbrain periaqueductal grey region**. In *Progress in Psychobiology and Physiology*. New York: Academic, 1987.
- BANNERMAN, D.M.; DEACON, R.M.J.; OFFEN, S.; FRISWELL, J.; GRUBB, M.; RAWLINS, J.N.P. Double dissociation of function within the hippocampus: spatial memory and hyponeophagia. **Behavioral Neuroscience**, 116: 884-901, 2002.

BANNERMAN, D.M.; GRUBB, M.; DEACON, R.M.J.; YEE, B.K.; FELDON, J.; RAWLINS, J.N.P. Ventral hippocampal lesions affect anxiety but not spatial learning. **Behavioural Brain Research**, 139: 197-213, 2003.

BANNERMAN, D.M.; RAWLINS, J.N.P.; MCHUGH, S.B.; DEACON, R.M.J.; YEE, B.K.; BAST, T.; ZHANG, W.N.; POTHUIZEN, H.H. Regional dissociations within the hippocampus-memory and anxiety. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 28: 273-283, 2004.

BANNERMAN, D.M.; YEE, B.K.; GOOD, M.A.; HEUPEL, M.J.; IVERSEN, S.D.; RAWLINS, J.N.P. Double dissociation of function within the hippocampus: a comparison of dorsal, ventral and complete hippocampal cytotoxic lesions. **Behavioral Neuroscience**, 113:1170-1188, 1999.

BAST, T.; ZHANG, W.N.; FELDON, J. The ventral hippocampus and fear conditioning in rats: Different anterograde amnesias of fear after tetrodotoxin inactivation and infusion of the GABA(A) agonist muscimol. **Experimental Brain Research**, 139: 39-52, 2001.

BAST, T.; ZHANG, W.N.; FELDON, J. Dorsal hippocampus and classical fear conditioning to tone and context in rats: effect of local NMDA-receptor blockade and stimulation. **Hippocampus**, 13: 657-675, 2003.

BERGINK, V.; MEGEN, H.J.; WESTENBERG, H.G. Glutamate and anxiety. **European Neuropsychopharmacology**, 14(3): 175-183, 2004.

BERTOGLIO, L.J.; JOCA, S.R.L.; GUIMARÃES, F.S. Further evidence that anxiety and memory are regionally dissociated within hippocampus. **Behavioural Brain Research**, 175: 183-188, 2006.

BLANCHARD, D.C.; BLANCHARD, R.J. Innate and conditioned reactions to threat in rats with amygdaloid lesions. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, 81: 281-290, 1972.

BLANCHARD, D.C.; CANTERAS, N.S.; MARKHAM, C.M.; PETROVICH, N.S.; BLANCHARD, R.J. Lesions of structures showing FOS expression to cat presentation: effects on responsivity to a cat, cat

odor, and nonpredator threat. **Neuroscience Biobehavioral Review**, 29(8): 1243-1253, 2005.

BLISS, T.V.; COLLINGRIDGE, G.L. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. **Nature**, 361(6407): 31-39, 1993.

BLISS, T.V.; LOMO, T. Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. **The Journal of Physiology**, 232(2): 331-356, 1973.

BURMAN, M.A.; STARR, M.J.; GEWIRTZ, J.C. Dissociable effects of hippocampus lesions on expression of fear and trace fear conditioning memories in rats. **Hippocampus**, 16(2): 103-113, 2006.

BUSH, D.E.A.; CAPAROSA, E.M.; GEKKER, A.; LEDOUX, J. Beta-adrenergic receptors in the lateral nucleus of the amygdala contribute to the acquisition but not to the consolidation of auditory fear conditioning. **Frontiers in Behavioral Neuroscience**, 4: 1-7, 2010.

CAMPEAU, S.; MISERENDINO, M.J.; DAVIS, M. Intra-amygdala infusion of the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist AP5 blocks acquisition but not expression of fear-potentiated startle to an auditory conditioned stimulus. **Behavioral Neuroscience**, 106: 569-574, 1992.

CANTERAS, N.S. The medial hypothalamic defensive system: Hodological organization and functional implications. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 71: 481-491, 2002.

CANTERAS, N.S.; CHIAVEGATTO, S; RIBEIRO DO VALLE, L.E.; SWANSON, L. W. Severe reduction of rat defensive behavior to a predator by discrete hypothalamic chemical lesions. **Brain Research Bulletin**, 44 (3): 141-156, 1997.

CANTERAS, N.S.; KROON, J.A.V.; DO-MONTE, F.H.M.; PAVESI, E.; CAROBREZ, A.P. Sensing danger through the olfactory system: the role of the hypothalamic dorsal preammillary nucleus. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 32: 1228-1235, 2008.

CANTERAS, N.S.; SIMERLY, R.B.; SWANSON, L.W. Connections of the posterior nucleus of the amygdala. **The Journal of Comparative Neurology**, 324, 143-179, 1992.

CARVALHO, M.C.; MASSON, S.; BRANDAO, M.L.; SOUZA SILVA, M.A. Anxiolytic-like effects of substance P administration into dorsal, but not ventral, hippocampus and its influence on serotonin. **Peptides**, 29: 1191-1200, 2008.

CASTILHO, V.M.; BRANDAO, M.L. Conditioned antinociception and freezing using electrical stimulation of the dorsal periaqueductal gray or inferior colliculus as unconditioned stimulus are differentially regulated by 5-HT<sub>2A</sub> receptors in rats. **Psychopharmacology**, 155: 154-162, 2001.

CAVALLI, J.; BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P. Pentylentetrazole as an unconditioned stimulus for olfactory and contextual fear conditioning in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, 92: 512-518, 2009.

CENQUIZCA, L.A.; SWANSON, L.W. Spatial organization of direct hippocampal field CA1 axonal projections to the rest of the cerebral cortex. **Brain Research Reviews**, 56: 1-26, 2007.

CHAPMAN, P.F.; KAIRISS, E.W.; KEENAN, C.L.; BROWN, T.H. Long-term synaptic potentiation in the amygdala. **Synapse**, 6(3): 271-278, 1990.

CHIBA, T. Collateral projections from the amygdalo-hippocampal transition area and CA1 to the hypothalamus and medial prefrontal cortex in the rat. **Neuroscience Research**, 38: 373-383, 2000.

CLUGNET, M.C.; LEDOUX, J.E. Synaptic plasticity in fear conditioning circuits: induction of LTP in the lateral nucleus of the amygdala by stimulation of medial geniculate body. **The Journal of Neuroscience**, 10 (8): 2818-2824, 1990.

COHEN, D.H. Involvement of the avian amygdalar homologue (archistriatum posterior and mediale) in defensively conditioned heart change. **The Journal of Comparative Neurology**, 160: 13-35, 1975.

CORCORAN, K.A.; MAREN, S. Hippocampal inactivation disrupts contextual retrieval of fear memory after extinction. **The Journal of Neuroscience**, 21(5): 1720-1726, 2001.

CZERNIAWSKI, J.; REE, F.; CHIA, C.; OTTO, T. Dorsal versus ventral hippocampal contributions to trace and contextual conditioning: differential effects of regionally selective NMDA receptor antagonism on acquisition and expression. **Hippocampus**, 22(7): 1528-1539, 2012.

CZERNIAWSKI, J.; YOON, T.; OTTO, T. Dissociating space and trace in dorsal and ventral hippocampus. **Hippocampus**, 19(1): 20-32, 2009.

DAVIS, M.; GENDELMAN, D.S.; TISCHLER, M.D.; GENDELMAN, P.M. A primary acoustic startle circuit: lesion and stimulation studies. **The Journal of Neuroscience**, 2: 791-805, 1982.

DAVIS, M.; MYERS, K.M. The role of glutamate and gamma-aminobutyric acid in fear extinction: clinical implications for exposure therapy. **Biological Psychiatry**, 52(10): 998-1007, 2002.

DEBIEC, J.; DOYERE, V.; NADER, K.; LEDOUX, J.E. Directly reactivated, but not indirectly reactivated, memories undergo reconsolidation in the amygdala. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 103(9): 3428-3433, 2006.

DEGROOT, A.; TREIT, D. Anxiety is functionally segregated within the septo-hippocampal system. **Brain Research**, 1001: 60-71, 2004.

DI SCALA, G.; MANA, M.J. JACOBS, W.J.; PHILLIPS, A.G. Evidence of Pavlovian conditioned fear following electrical stimulation of the periaqueductal grey in the rat. **Physiology and Behavior**, 40:55-63, 1987.

DIELENBERG, R.A.; LEMAN, S.; CARRIVE, P. Effect of dorsal periaqueductal gray lesions on cardiovascular and behavioral responses to cat odor exposure in rats. **Behavioural Brain Research**, 153(2): 487-496, 2004.

DZIDZISHVILI, N.; DAVITULIANI, D. Effect of bilateral suprasylvian ablation on fear behavior elicited by hippocampal stimulation in cats. **Acta Neurobiologiae Experimentalis**, 38: 271-282, 1978.

DO MONTE, F.H.; CANTERAS, N.S.; FERNANDES, D.; CAROBREZ, A.P. New perspectives on beta-adrenergic mediation of innate and learned fear responses to predator odor. **The Journal of Neuroscience**, 28(49): 13296-13302, 2008.

DOLORFO, C.L.; AMARAL, D.G. Entorhinal cortex of the rat: organization of intrinsic connections. **The Journal of Comparative Neurology**, 398: 49-82, 1998.

DONG, H.W.; PETROVICH, G.D.; SWANSON, L.W. Topography of projections from amygdala to bed nuclei of the stria terminalis. **Brain Research Reviews**, 38: 192-246, 2001.

DONG, H.W.; SWANSON, L.W. Projections from bed nuclei of the stria terminalis, anteromedial area: cerebral hemisphere integration of neuroendocrine, autonomic, and behavioral aspects of energy balance. **The Journal of Comparative Neurology**, 494: 142-178, 2006.

DONG, H.W.; SWANSON, L.W.; CHEN, L.; FANSELOW, M.S.; TOGA, A.W. Genomic-anatomic evidence for distinct functional domains in hippocampal field CA1. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 106: 11794-11799, 2009.

DONLEY, M.P.; SCHULKIN, J.; ROSEN, J.B. Glucocorticoid receptor antagonism in the basolateral amygdala and ventral hippocampus interferes with long-term memory of contextual fear. **Behavioural Brain Research**, 164(2): 197-205, 2005.

DUDAI, Y. Reconsolidation: the advantage of being refocused. **Current Opinion in Neurobiology**, 16: 174-178, 2006.

ESCLASSAN, F.; COUTUREAU, E.; DI SCALA, G.; MARCHAND, A.R. Differential contribution of dorsal and ventral hippocampus to trace and delay fear conditioning. **Hippocampus**, 19(1): 33-44, 2009.



FANSELOW, M.S. Associations and memories: The role of NMDA receptors and long-term potentiation. **Current Directions in Psychological Science**, 2: 152-156, 1993.

FANSELOW, M.S. Neural organization of the defensive behavior system responsible for fear. **Psychonomic Bulletin & Review**, 1: 429-438, 1994.

FANSELOW, M.S.; DONG, H. Are the dorsal and ventral hippocampus functionally distinct structures? **Neuron**, 65: 7-18, 2010.

FENDT, M.; FANSELOW, M.S. The neuroanatomical and neurochemical basis of conditioned fear. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 23: 743-760, 1999.

FERBINTEANU, J.; RAY, C.; MCDONALD, R.J. Both dorsal and ventral hippocampus contribute to spatial learning in Long-Evans rats. **Neuroscience Letters**, 345(2): 131-135, 2003.

FRANKLAND, P.W.; BONTEMPI, B.; TALTON, L.E.; KACZMAREK, L.; SILVA, A.J. The involvement of the anterior cingulate cortex in remote contextual fear memory. **Science**, 304: 881-883, 2004.

FREY, U.; MORRIS, R.G.M. Synaptic-tagging and long-term potentiation. **Nature**, 385: 533-536, 1997.

GALE, G.D.; ANAGNOSTARAS, S.G.; GODSIL, B.P.; MITCHELL, S.; NOZAWA, T.; SAGE, J.R.; WILTGEN, B.; FANSELOW, M. Role of the basolateral amygdala in the storage of fear memories across the adult lifetime of rats. **The Journal of Neuroscience**, 24(25): 3810-3815, 2004.

GARAKANI, A.; MATHEW, S.J.; CHARNEY, D.S. Neurobiology of anxiety disorders and implications for treatment. **The Mount Sinai Journal of Medicine**, 73 (7): 941-949, 2006.

GEWIRTZ; J.C.; DAVIS, M. Second-order fear conditioning prevented by blocking NMDA receptors in amygdala. **Nature**, 388: 471-474, 1997.

GEWIRTZ, J.C.; DAVIS, M. Application of Pavlovian higher-order conditioning to the analysis of the neural substrates of fear conditioning. **Neuropharmacology**, 37 (4-5): 453-459, 1998.

GEWIRTZ, J.C.; DAVIS, M. Using Pavlovian higher-order conditioning paradigms to investigate the neural substrates of emotional learning and memory. **Learning and Memory**, 7 (5): 257-266, 2000.

GILMARTIN, M.R.; KWAPIS, J.L.; HELMSTETTER, F.J. Trace and contextual fear conditioning are impaired following unilateral microinjection of muscimol in the ventral hippocampus or amygdala, but not the medial prefrontal cortex. **Neurobiology of Learning and Memory**, 97: 452-464, 2012.

GONZALEZ-PARDO, H.; CONEJO, N.M.; LANA, G.; ARIAS, J.L. Different brain networks underlying the acquisition and expression of contextual fear conditioning: a metabolic mapping study. **Neuroscience**, 202: 234-242, 2012.

GRAEFF, F.; CAROBREZ, A.P.; SILVEIRA, M.C.L. **Excitatory amino acids and the brain aversive system**. In: Cavalheiro, E.A.; Lehmann, J.; Turski, L. (Ed.) *Neurology and Neurobiology*. New York: Liss. *Frontiers in excitatory amino acids research*, 46: 325-332, 1988.

GRAY, J.A.; MCNAUGHTON, N. **The neuropsychology of anxiety: an enquiry into the functions of the septo-hippocampal system**. Second edition, Oxford University Press, 2000.

GROENEWEGEN, H.J.; WRIGHT, C.I.; BEIJER, A.V. The nucleus accumbens: gateway for limbic structures to reach the motor system? **Progress in Brain Research**, 107: 485-511, 1996.

GROSS, C.T.; CANTERAS, N.S. The many paths to fear. *Nature Reviews Neuroscience*, 13(9): 651-658, 2012.

HACKL, L.P. **Dissociação funcional dorso-ventral do hipocampo na mediação defensiva de ratos revelada pelo bloqueio dos receptores glutamatérgicos subtipo NMDA**. (Tese de Doutorado) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2007.

HAIJIMA, A.; ICHITANI, Y. Dissociable anterograde amnesic effects of retrosplenial cortex and hippocampal lesions on spontaneous object recognition memory in rats. **Hippocampus**, 22(9): 1868-1875, 2012.

HATFIELD, T.; HAN, J.; CONLEY, M.; GALLAGHER, M.; HOLLAND, P. Neurotoxic lesions of basolateral, but not central, amygdala interfere with Pavlovian second-order conditioning and reinforce devaluation effects. **The Journal of Neuroscience**, 16(16): 5256-5265, 1996.

HERZ, R.S. Emotion experienced during encoding enhances odor retrieval cue effectiveness. **American Journal of Psychology**, 110: 489-505, 1997.

HUNSAKER, M.R.; KESNER, R.P. Dissociations across the dorsal-ventral axis of CA3 and CA1 for encoding and retrieval of contextual and auditory-cued fear. **Neurobiology of Learning and Memory**, 89: 61-69, 2008.

ISHIZUKA, N. Laminar organization of the pyramidal cell layer of the subiculum in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, 435: 89-110, 2001.

IZQUIERDO, I.; CAMMAROTA, M.; MEDINA, J.H.; BEVILAQUA, R.M. Pharmacological findings on the biochemical bases of memory processes: a general view. **Neural Plasticity**, 11(3-4): 159-189, 2004.

IZQUIERDO, I.; DA CUNHA, C.; ROSAT, R.; JERUSALINSKY, D.; FERREIRA, M.B.C.; MEDINA, J.H. Neurotransmitter receptors involved in post-training memory processing by the amygdala, medial septum and hippocampus of the rat. **Behavioral and Neural Biology**, 58: 16-26, 1992.

IZQUIERDO, I.; QUILLFELDT, J.A.; ZANATTA, M.S.; QUEVEDO, J.; SCHAEFFER, E.; SCHMITZ, P.K.; MEDINA, J.H. Sequential role of hippocampus and amygdala, entorhinal cortex and parietal cortex in formation and retrieval of memory for inhibitory avoidance in rats. **European Journal of Neuroscience**, 9(4): 786-793, 1997.

JARRARD, L.E. Selective hippocampal lesions: differential effects on performance by rats of a spatial task with preoperative versus

postoperative training. **Journal of Comparative Physiological Psychology**, 92: 1119-1127, 1978.

JEFFERY, K.J. Integration of the sensory inputs to place cells: what, where, why and how? **Hippocampus**, 17: 775-785, 2007.

JENCK, F.; MOREAU, J.L.; MARTIN, J.R. Dorsal periaqueductal gray-induced aversion as a stimulation of panic anxiety: elements of face and predictive validity. **Psychiatry Research**, 57: 181-191, 1995.

JUNG, M.W.; WIENER, S.I.; MCNAUGHTON, B.L. Comparison of spatial firing characteristics of units in dorsal and ventral hippocampus of the rat. **The Journal of Neuroscience**, 14(12): 7347-7356, 1994.

KAADA, B.R.; FELDMAN, R.S.; LANGFELDT, T. Failure to modulate autonomic reflex discharge by hippocampal stimulation in rabbits. **Physiology and Behavior**, 7: 225-231, 1971.

KARL, A.; SCHAEFER, M.; MALTA, L.S.; DORFEL, D.; ROHLEDER, N.; WERNER, A. A meta-analysis of structural brain abnormalities in PTSD. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 30: 1004-1031, 2006.

KELLEY, A.E.; BALDO, B.A.; PRATT, W.E. A proposed hypothalamic-thalamic-striatal axis for the integration of energy balance, arousal, and food reward. **The Journal of Comparative Neurology**, 493, 72-85, 2005.

KELLEY, A.E.; BALDO, B.A.; PRATT, W.E.; WILL, M.J. Corticostriatal-hypothalamic circuitry and food motivation: integration of energy, action and reward. **Physiology and Behavior**, 86: 773-795, 2005.

KELLICUTT, M.H.; SCHWARTZBAUM, J.S. Formation of a conditioned emotional response (CER) following lesions of the amygdaloid complex in rats. **Psychological Reports**, 12:351-358, 1963.

KEW, J.N.C.; KEMP, J.A. Ionotropic and metabotropic glutamate receptor structure and pharmacology. **Psychopharmacology**, 179: 4-29, 2005.

KIM, M.; DAVIS, M. Electrolytic lesions of the amygdala block acquisition and expression of fear-potentiated startle even with extensive training but do not prevent reacquisition. **Behavioral Neuroscience**, 107(4): 580-595, 1993.

KIM, J.J.; CLARK, R.E.; THOMPSON, R.F. Hippocampectomy impairs the memory of recently, but not remotely, acquired trace eyeblink conditioned responses. **Behavioral Neuroscience**, 109(2): 195-203, 1995.

KIM, J.J.; FANSELOW, M.S. (1992) Modality-specific retrograde amnesia of fear. **Science**, 256(5057): 675-7

KIM, J.J.; JUNG, M.W.; Neural circuits and mechanisms involved in Pavlovian fear conditioning: A critical review. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, 30: 188-202, 2006.

KINCHESKI, G.C. **Condicionamento olfatório aversivo induzido pela estimulação química da matéria cinzenta periaquedutal dorsolateral de ratos.** (Tese de Doutorado) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011.

KISH, T.; TSUMORI, T.; ONO, K.; YOKOTA, S.; ISHINO, H.; YASUI, Y. Topographical organization of projections from the subiculum to the hypothalamus in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, 419: 205-222, 2000.

KITAYAMA, N.; VACCARINO, V.; KUTNER, M.; WEISS, P.; BREMNER, J.D. Magnetic resonance imaging (MRI) measurement of hippocampal volume in posttraumatic stress disorder: a meta-analysis. **Journal of Affective Disorders**, 88: 79-86, 2005.

KJELSTRUP, K.G.; TUVNES, F.A.; STEFFENACH, H.; MURISON, R.; MOSER, E.I.; MOSER, M. Reduced fear expression after lesions of the ventral hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 99(16): 10825-10830, 2002.

KLINE, N.A.; RAUSCH, J.L. Olfactory precipitants of flashbacks in posttraumatic stress disorder: case reports. **The Journal of Clinical Psychiatry**, 46: 383-384, 1985.

KROON, J.A.V.; CAROBREZ, A.P. Olfactory fear conditioning paradigm in rats: effects of midazolam, propranolol or scopolamine. **Neurobiology of Learning and Memory**, 91(1): 32-40, 2009.

LEDOUX, J.E. Emotion circuits in the brain. **Annual Review of Neuroscience**, 23: 155-184, 2000.

LEDOUX, J.E.; CICCHETTI, P.; XAGORARIS, A.; ROMANSKI, L.M. The lateral amygdaloid nucleus: sensory interface of the amygdala in fear conditioning. **The Journal of Neuroscience**, 10: 1062-1069, 1990.

LEDOUX, J.E.; IWATA, J.; CICCHETTI, P.; REIS, D.J. Different projections of the central amygdaloid nucleus mediate autonomic and behavioral correlates of conditioned fear. **The Journal of Neuroscience**, 8: 2517-2529, 1988.

LEDOUX, J.E.; SAKAGUCHI, A.; REIS, D.J. Subcortical efferent projections of the medial geniculate nucleus mediate emotional responses conditioned to acoustic stimuli. **The Journal of Neuroscience**, 4: 683-698, 1984.

LEE, I.; KESNER, R.P. Differential contribution of NMDA receptors in hippocampal subregions to spatial working memory. **Nature Neuroscience**, 5(2): 162-168, 2002.

LEE, I.; KESNER, R.P. Differential contributions of dorsal hippocampal subregions to memory, acquisition and retrieval in contextual fear-conditioning. **Hippocampus**, 14: 301-310, 2004.

LEE, Y.; WALKER, D.; DAVIS, M. Lack of a temporal gradient of retrograde amnesia following NMDA-induced lesions of the basolateral amygdala assessed with the fear-potentiated startle paradigm. **Behavioral Neuroscience**, 110(4): 836-839, 1996.

LLEDO, P.M.; GHEUSI, G. VINCENT, J.D. Information processing in the mammalian olfactory system. **Physiological Reviews**, 85(1): 281-317, 2005.

LOUREIRO, M.; LECOURTIER, L.; ENGELN, M.; LOPEZ, J.; COSQUER, B.; GEIGER, K.; KELCHE, C.; CASSEL, J.C.; PEREIRA

DE VASCONCELOS, A. The ventral hippocampus is necessary for expressing a spatial memory. **Brain Structure and Function**, 217(1): 93-106, 2012.

MAREN, S. Long-term potentiation in the amygdala: a mechanism for emotional learning and memory. **Trends Neuroscience**, 22: 561-567, 1999a.

MAREN, S. Neurotoxic basolateral amygdala lesions impair learning and memory but not performance of conditional fear in rats. **The Journal of Neuroscience**, 19(19): 8696-8703, 1999b.

MAREN, S. Neurobiology of Pavlovian fear conditioning. **Annual Review of Neuroscience**, 24: 897-931, 2001.

MAREN, S.; AHARONOV, G.; STOTE, D.L.; FANSELOW, M. N-methyl-D-aspartate receptors in the basolateral amygdala are required for both acquisition and expression of conditional fear in rats. **Behavioral Neuroscience**, 110(6): 1365-1374, 1996.

MAREN, S.; FANSELOW, M. Synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by hippocampal formation stimulation in vivo. **The Journal of Neuroscience**, 15(11): 7548-7564, 1995.

MAREN, S.; FERRARIO, C.R.; CORCORAN, K.A.; DESMOND, T.J.; FREY, K.A. Protein synthesis in the amygdala, but not the auditory thalamus, is required for consolidation of Pavlovian fear conditioning in rats. **The European Journal of Neuroscience**, 18(11): 3080-3088, 2003.

MAREN, S.; HOLT, W. The hippocampus and the contextual memory retrieval in Pavlovian conditioning. **Behavioural Brain Research**, 110: 97-108, 2000.

MAREN, S.; HOLT, W.G. Hippocampus and Pavlovian Fear Conditioning in Rats: Muscimol Infusions Into the Ventral, but Not Dorsal, Hippocampus Impair the Acquisition of Conditional Freezing to an Auditory Conditional Stimulus. **Behavioral Neuroscience**, 118(1):97-110, 2004.

- MARTINEZ, R.C.; DE OLIVEIRA, A.R.; BRANDAO, M.L. Conditioned and unconditioned fear organized in the periaqueductal gray are differentially sensitive to injections of muscimol into amygdaloid nuclei. **Neurobiology of Learning and Memory**, 85: 58-65, 2006.
- MCECHRON, M.D.; BOUWMEESTER, H.; TSENG, W.; WEISS, C.; DISTERHOFT, J.F. Hippocampectomy disrupts auditory trace fear conditioning and contextual fear conditioning in the rat. **Hippocampus**, 8(6): 638-646, 1998.
- MCECHRON, M.D.; TSENG, W.; DISTERHOFT, J.F. Neurotoxic lesions of the dorsal hippocampus disrupt auditory-cued trace heart rate (fear) conditioning in rabbits. **Hippocampus**, 10(6): 739-751, 2000.
- MCGAUGH, J.L. Memory – a century of consolidation. **Science**, 287: 248-251, 2000.
- MCGAUGH, J.L. The amygdala modulates the consolidation of memories of emotionally arousing experiences. **Annual Review of Neuroscience**, 27: 1-28, 2004.
- MELIK, E.; BABAR, E.; OZEN, E.; OZGUNEN, T. Hypofunction of the dorsal hippocampal NMDA receptors impairs retrieval of memory to partially presented foreground context in a single-trial fear conditioning in rats. **European Neuropsychopharmacology**, 16: 241-247, 2006.
- MISERENDINO, M.J.; SANANES, C.B.; MELIA, K.R.; DAVIS, M. Blocking of acquisition but not expression of conditioned fear-potentiated startle by NMDA antagonists in the amygdala. **Nature**, 345: 716-718, 1990.
- MORAES, C.L.; BERTOGLIO, L.J.; CAROBREZ, A.P. Interplay between glutamate and serotonin within the dorsal periaqueductal gray modulates anxiety-related behavior of rats exposed to the elevated plus-maze. **Behavioural Brain Research**, 194(2): 181-186, 2008.
- MORRIS, R.G.M. Spatial localization does not require the presence of local cues. **Learning and Motivation**, 12: 239-260, 1981.



MORRIS, R.G.M.; GARRUD, P.; RAWLINS, J.N.P.; O'KEEFE, J. Place navigation impaired in rats with hippocampal lesions. **Nature**, 297: 681-683, 1982.

MOSER, E.I.; MOSER, M.B.; ANDERSEN, P. Spatial learning impairment parallels the magnitude of dorsal hippocampal lesions, but is hardly present following ventral lesions. **The Journal of Neuroscience**, 13: 3916-3925, 1993.

MOSER, M.B.; MOSER, E.I.; FORREST, E.; ANDERSEN, P.; MORRIS, R.G.M. Spatial learning with a minislab in the dorsal hippocampus. **Proceedings of the National Academy of Sciences of USA**, 92: 9697-9701, 1995.

MOSER, M.; MOSER, E. Functional differentiation in the hippocampus. **Hippocampus**, 8:608-619, 1998.

MOYER, J.R.; DEYO, R.A.; DISTERHOFT, J.F. Hippocampectomy disrupts eye-blink conditioning in rats. **Behavioral Neuroscience**, 104(2): 242-252, 1990.

NABER, P.A.; WITTER, M.P. Subicular efferents are organized mostly as parallel projections: a double-labeling, retrograde-tracing study in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, 393: 284-297, 1998.

NADER, K.; SCHAFE, G.E.; LEDOUX, J.E. Fear memories require protein synthesis in the amygdala for reconsolidation after retrieval. **Nature**, 406: 722-726, 2000.

NASCIMENTO HACKL, L.P.; CAROBREZ, A.P. Distinct ventral and dorsal hippocampus AP5 anxiolytic effects revealed in the elevated plus-maze task in rats. **Neurobiology of Learning and Memory**, 88: 177-185, 2007.

O'KEEFE, J.; DOSTROVSKY, J. The hippocampus as a spatial map. Preliminary evidence from unit activity in the freely-moving rat. **Brain Research**, 34: 171-175, 1971.

O'KEEFE, J.; NADEL, L. **The hippocampus as a cognitive map**. Oxford University Press, 1978.

OLTON, D.S.; SAMUELSON, R.J. Remembrance of places passed: spatial memory in rats. **Journal of Experimental Psychology: Animal Behavior Process**, 2: 97-116, 1976.

OLTON, D.S.; WALKER, J.A.; GAGE, F.H. Hippocampal connections and spatial discrimination. **Brain Research**, 139: 295-308, 1978.

OTTO, T.; POON, P. Dorsal hippocampal contributions to unimodal contextual conditioning. **The Journal of Neuroscience**, 26(24): 6603-6609, 2006.

PANDIS, C.; SOTIRIOU, E.; KOUVARAS, E.; ASPRODINI, E.; PAPTAEODOROPOULOS, C.; ANGELATOU, F. Differential expression of NMDA and AMPA receptor subunits in rat dorsal and ventral hippocampus. **Neuroscience**, 140: 163-175, 2008.

PAVESI, E.; CANTERAS, N.S.; CAROBREZ, A.P. Acquisition of Pavlovian fear conditioning using  $\beta$ -adrenoceptor activation of the dorsal premammillary nucleus as an unconditioned stimulus to mimic live predator-threat exposure. **Neuropsychopharmacology**, 1-14, 2011.

PAVLOV, I.P. **Conditioned reflexes: An Investigation of the Physiological Activity of the Cerebral Cortex**. London, Oxford University Press, 1927.

PARKERS, S.L.; WESTBROOK, R.F. The basolateral amygdala is critical for the acquisition and extinction of associations between a neutral stimulus and a learned danger signal but not between two neutral stimuli. **The Journal of Neuroscience**, 30(38): 12608-12618, 2010.

PAXINOS, G.; WATSON, C. **The rat brain in stereotaxic coordinates**. (4<sup>th</sup> ed.), New York: Academic Press, 1998.

PENTKOWSKI, N.S.; BLANCHARD, D.C.; LEVER, C.; LITVIN, Y.; BLANCHARD, R.J. Effects of lesions to the dorsal and ventral hippocampus on defensive behaviors in rats. **European Journal of Neuroscience**, 23: 2185-2196, 2006.

PETROVICH, G.D.; CANTERAS, N.S.; SWANSON, L.W. Combinatorial amygdalar inputs to hippocampal domains hypothalamic behavior systems. **Brain Research Reviews**, 38: 247-289, 2001.

PHILLIPS, R.G.; LEDOUX, J.E. Differential contribution of amygdala and hippocampus to cued and contextual fear conditioning. **Behavioral Neuroscience**, 106 (2): 274-285, 1992.

PHILLIPS, R.G.; LEDOUX, J.E. Lesions of the dorsal hippocampal formation interfere with background but not foreground contextual fear conditioning. **Learning and Memory**, 1(1): 34-44, 1994.

PITKANEN, A.; PIKKARAINEN, M.; NURMINEN, N.; YLINEN, A. Reciprocal connections between the amygdala and the hippocampal formation, perirhinal cortex and postrhinal cortex in rat. A review. **Annals of the NY Academy of Sciences**, 911: 369-391, 2000.

POTHUIZEN, H.H.; AGGLETON, J.P.; VANN, S.D. Do rats with retrosplenial cortex lesions lack direction? **European Journal of Neuroscience**, 28(12): 2486-2498, 2008.

POTHUIZEN, H.J.; ZHANG, W.; JONGEN-RELO, A.L.; FELDON, J.; YEE, B.K. Dissociation of function between the dorsal and the ventral hippocampus in spatial learning abilities of the rat: a within-subject, within-task comparison of reference and working spatial memory. **European Journal of Neuroscience**, 19: 705-712, 2004.

QUINN, J.J.; LOYA, F.; MA, Q.D.; FANSELOW, M. Dorsal hippocampus NMDA receptors differentially mediate trace and contextual fear conditioning. **Hippocampus**, 15: 665-674, 2005.

QUINN, J.J.; OOMMEN, S.S.; MORRISON, G.E.; FANSELOW, M. Post-training lesions of the dorsal hippocampus attenuate forward trace, backward trace and delay fear conditioning in a temporally specific manner. **Hippocampus**, 12(4): 495-504, 2002.

QUIRK, G.J.; MUELLER, D. Neural mechanisms of extinction learning and retrieval. **Neuropsychopharmacology**, 33: 56-72, 2008.

RAYBUCK, J.D.; GOULD, T.J. The role of nicotinic acetylcholine receptors in the medial pre frontal cortex and hippocampus in trace fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, 94(3): 353-363, 2010.

RESTIVO, L.; VETERE, G.; BONTEMPI, B.; AMMASSARI-TEULE, M. The formation of recent and remote memory is associated with time-dependent formation of dendritic spines in the hippocampus and anterior cingulate cortex. **The Journal of Neuroscience**, 29(25): 8206-8214, 2009.

RESTREPO, D.; ARELLANO, J.; OLIVA, A.M.; SCHAEFER, M.L.; LIN, W. Emerging views on the distinct but related roles of the main and accessory olfactory systems in responsiveness to chemosensory signals in mice. **Hormones and Behavior**, 46 (3): 247-56, 2004.

RICHMOND, M.A.; YEE, B.K.; POUZET, B.; VEENMAN, L.; RAWLINS, J.N.P.; FELDON, J.; BANNERMAN, D.M. Dissociating Context and Space Within the Hippocampus: Effects of Complete, Dorsal, and Ventral Excitotoxic Hippocampal Lesions on Conditioned Freezing and Spatial Learning. **Behavioral Neuroscience**, 113(6): 1189-1203, 1999.

RIEDEL, G.; PLATT, B.; MICHEAU, J. Glutamate receptor function in learning and memory. **Behavioural Brain Research**, 140: 1-47, 2003.

RISOLD, P.Y.; SWANSON, L.W. Structural evidence for functional domains in the rat hippocampus. **Science**, 272: 1484-1486, 1996.

RISOLD, P.Y.; THOMPSON, R.H.; SWANSON, L.W. The structural organization of connections between hypothalamus and cerebral cortex. **Brain Research Reviews**, 24: 197-254, 1997.

ROESLER, R.; VIANNA, M.; SANT'ANNA, M.K.; KUYVEN, C.R.; KRUEL, A.V.C.; FERREIRA, M.B.C. Intrahippocampal infusion of the NMDA receptor antagonist AP5 impairs retention of an inhibitory avoidance task: protection from impairment by pretraining or pre-exposure to the task apparatus. **Neurobiology of Learning and Memory**, 69: 87-91, 2006.

ROGAN, M.T.; LEDOUX, J.E. Emotion; systems, cells, synaptic plasticity. **Cell**, 85(4): 469-475, 1996.

ROGERS, J.L.; HUNSAKER, M.R.; KESNER, R.P. Effects of ventral and dorsal CA1subregional lesions on trace fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, 86(1): 72-81, 2006.

SACCHETI, B.; SCELFO, B.; STRATA, P. Cerebellum and emotional behavior. **Neuroscience**, 162: 756-762, 2009.

SCHAFE, G.E.; LEDOUX, J.E. Memory consolidation of auditory Pavlovian fear conditioning requires protein synthesis and protein kinase A in the amygdala. **The Journal of Neuroscience**, 20 (18): RC96.

SCHENBERG, E.E.; OLIVEIRA, M.G. Effects of pre or posttraining dorsal hippocampus D-AP5 injection on fear conditioning to tone, background, and foreground context. **Hippocampus**, 18(11): 1089-1093, 2008.

SCHUFF, N.; NEYLAN, T.C.; LENOCI, M.A.; DU, A.T.; WEISS, D.S.; MARMAR, C.R.; WEINER, M.W. Decreased hippocampal N-acetylaspartate in the absence of atrophy in posttraumatic stress disorder. **Biological Psychiatry**, 50(12): 952-959, 2001.

SELLEN, N.R.; EVERITT, B.J.; JARRARD, L.E.; ROBBINS, T.W. Complementary roles for the amygdala and hippocampus in aversive conditioning to explicit and contextual cues. **Neuroscience**, 42(2): 335-350, 1991.

SETLOW, B.; GALLAGHER, M.'; HOLLAND, P.C. The basolateral complex of the amygdala is necessary for acquisition but not expression of CS motivational value in appetitive Pavlovian second-order conditioning. **European Journal of Neuroscience**, 15: 1841-1853, 2002.

SHORS, T.; BEYLIN, A.; WOOD, G.E.; GOULD, E. The modulation of Pavlovian memory. **Behavioural Brain Research**, 110: 39-52, 2000.

SMITH, M.E. Bilateral hippocampal volume reduction in adults with posttraumatic stress disorder: a meta-analysis of structural MRI studies. **Hippocampus**, 15: 798-807, 2005.

SOTRES-BAYON, F.; BUSH, D.E.A.; LEDOUX, J. Emotional perseveration: an update on prefrontal-amygdala interactions in fear extinction. **Learning and Memory**, 11: 525-535, 2004.

SOUZA, R.R. **Papel dos corticosteroides no processamento de memórias aversivas: conseqüências bidirecionais no condicionamento olfatório de medo.** (Tese de Doutorado) Universidade Federal de Santa Catarina. Florianópolis, 2011.

SPOLIDORIO, P.C.M.; ECHEVERRY, M.B.; IYOMASA, M.; GUIMARAES, F.S.; DEL BEL, E.A. Anxiolytic effects induced by inhibition of the nitric oxide-cGMP pathway in the rat dorsal hippocampus. **Psychopharmacology**, 195: 183-192, 2007.

STEELE, R.J.; MORRIS, R.G. Delay-dependent impairment of a matching-to-place task with chronic and intrahippocampal infusion of the NMDA-antagonist D-AP5. **Hippocampus**, 9(2): 118-136, 1999.

SURRIA-MERCADO, D.; PADILHA-COREANO, N.; QUIRK, G.J. Dissociable roles of prelimbic and infralimbic cortices, ventral hippocampus, and basolateral amygdala in the expression and extinction of conditioned fear. **Neuropsychopharmacology**, 36(2): 529-538, 2011.

SWANSON, L.W.; COWAN, W.M. Hippocampo-hypothalamic connections: origin in subicular cortex, not Amon's horn. **Science**, 189: 303-304, 1975.

SWANSON, L.W.; COWAN, W.M. An autoradiographic study of the organization of the efferent connections of the hippocampal formation in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, 172: 49-84, 1977.

SWANSON, L.W.; KALIVAS, P.W. Regulation of locomotor activity metabotropic glutamate receptor in the nucleus accumbens and ventral tegmental area. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 292: 406-414, 2000.

SWANSON, L.W.; KOHLER, C. Anatomical evidence for direct projections from the entorhinal area to the entire cortical mantle in the rat. **The Journal of Neuroscience**, 6: 3010-3023, 1986.

TANG, J.; KO, S.; DING, H.K.; QIU, C.S.; CALEJESAN, A.A.; ZHUO, M. Pavlovian fear memory induced by the activation of anterior cingulate cortex. **Molecular Pain**, 1:6, 2005.

TAUBE, J.S. The head direction signal: origins and sensory-motor integration. **Annual Review of Neuroscience**, 30: 181-207, 2007.

THIERRY, A.; GIOANNI, Y.; DÉGÉNÉTAIS, E.; GLOWINSKI, J. Hippocampo-prefrontal cortex pathway: anatomical and electrophysiological characteristics. **Hippocampus**, 10: 411-419, 2000.

THOMPSON, C.L.; PATHAK, S.D.; JEROMIN, A.; NQ, L.L.; MACPHERSON, C.R.; MORTRUD, M.T.; CUSICK, A.; RILEY, Z.L.; SUNKIN, S.M.; BERNARD, A.; PUCHALSKI, R.B.; GAGE, F.H.; JONES, A.R.; BAJIC, V.B.; HAWRYLYCZ, M.J.; LEIN, E.S. Genomic anatomy of the hippocampus. **Neuron**, 60(60): 1010-1021, 2008.

TRIVEDI, M.A.; COOVER, G.D. Lesions of the ventral hippocampus, but not dorsal hippocampus, impair conditioned fear expression and inhibitory avoidance on the elevated T-maze. **Neurobiology of Learning and Memory**, 81: 171-184, 2004.

TRONEL, S.; MILEKIC, M.H.; ALBERINI, C.M. Linking new information to a reactivated memory requires consolidation and not reconsolidation mechanisms. **Plos Biology**, 3(9): 1630-1638, 2005.

URSIN, R.; URSIN, H.; OLDS, J. Self-stimulation of hippocampus in rats. **Journal of Comparative and Physiological Psychology**, 61(3): 353-359, 1966.

VAN GROEN, T.; WYSS, J.M. Connections of the retrosplenial granular b cortex in the rat. **The Journal of Comparative Neurology**, 463: 249-263, 2003.

VERMETTEN, E.; SCHMAHL, C.; SOUTHWICK, S.M.; BREMNER, J.D. Positron tomographic emission of olfactory induced emotional recall in veterans with and without combat-related posttraumatic stress disorder. **Psychopharmacology Bulletin**, 40(1): 8-10, 2007.

VOGT, B.A.; MILLER, M.W. Cortical connections between rat cingulate cortex and visual, motor, and postsubicular cortices. **The Journal of Comparative Neurology**, 216: 192-210, 1983.

WALKER, D.L.; DAVIS, M. The role of amygdala glutamate receptors in fear learning, fear-potentiated startle and extinction. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, 71(3): 379-392, 2002.

WATSON, J.B.; RAYNER, R. Conditioned emotional reactions. **Journal of Experimental Psychology**, 3:1-14, 1920.

YOON, T.; OTTO, T. Differential contributions of dorsal vs. ventral hippocampus to auditory fear conditioning. **Neurobiology of Learning and Memory**, 87(4): 464-475, 2007.

YOUNG, S.L.; BOHENEK, D.L.; FANSELOW, M.S. NMDA processes mediate anterograde amnesia of contextual fear conditioning induced by hippocampal damage: immunization against amnesia by context preexposure. **Behavioural Neuroscience**, 108(1): 19-29, 1994.

ZHANG, W.; BAST, T.; FELDON, J. The ventral hippocampus and fear conditioning in rats: different anterograde amnesias of fear after infusions of N-methyl-D-aspartate or its noncompetitive antagonist MK-801 into the ventral hippocampus. **Behavioural Brain Research**, 126: 159-174, 2001.